

UNIVERSITÉ DE NANCY.
1933-1934.

FACULTÉ DE PHARMACIE
2^e Série. - N° 63

ETUDE COMPARATIVE
DE
Trois Bactéries Chromogènes
à Pigment rouge

Serratia marcescens BIZIO (*Bacillus prodigiosus* FLÜGGE)
Serratia kiliensis COMITE S. B. A. (*Bacterium h* BREUNIG)
Serratia esseyana n. sp. COMBE (*Bacille rouge d'Essey* LASSEUR)

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement le 28 FEV. 1934
à la Faculté de Pharmacie de Nancy

POUR OBTENIR LE TITRE DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

PAR

M. COMBE (Emmanuel)

Pharmacien

Diplômé de Microbiologie
Lauréat de l'Ecole de Médecine et de Pharmacie de Besançon
Né à Molrans (Jura), le 1^{er} octobre 1906

Examineurs de Thèse { MM. LASSEUR, président ;
GILLOT
VERNIER juges.

GAP
Imprimerie Louis JEAN

1933

1934



Digitized by the Internet Archive
in 2026

ETUDE COMPARATIVE
DE
**Trois Bactéries Chromogènes
à Pigment rouge**

Serratia marcescens BIZIO (*Bacillus prodigiosus* FLÜGGE)
Serratia kiliensis COMITE S. B. A. (*Bacterium h* BREUNIG)
Serratia esseyana n. sp. COMBE (*Bacille rouge d'Essey* LASSEUR)

THÈSE

*Présentée et soutenue publiquement le
à la Faculté de Pharmacie de Nancy*

POUR OBTENIR LE TITRE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

PAR

M. COMBE (Emmanuel)

Pharmacien

Diplômé de Microbiologie

Lauréat de l'Ecole de Médecine et de Pharmacie de Besançon

Né à Moirans (Jura), le 1^{er} octobre 1906

Examineurs de Thèse { MM. LASSEUR, président ;
GILLOT
VERNIER juges.

GAP

Imprimerie Louis JEAN

1393

PERSONNEL ENSEIGNANT

Doyen honoraire

L. BRUNTZ, *, †, I ☉, O ☉, ✕, ✕, Recteur de l'Université de Nancy.

Professeurs honoraires

MM. FAVREL, *, I. ☉.

BRUNTZ, *, †, I ☉, O ☉, ✕, ✕.

Doyen

M. SEYOT, *, †, I ☉, ☉.

Assesseur

M. GILLOT, I ☉, ☉.

Professeurs

MM.

GRELOT, *, I ☉, ☉	Pharmacie galénique.
DOURIS, I ☉, ☉, ✕	Toxicologie.
PASTUREAU, O *, I ☉	Pharmacie chimique.
SEYOT, *, †, I ☉, ☉	Histoire naturelle.
LASSEUR, I ☉, ☉	Microbiologie.
GILLOT, I ☉, ☉	Matière médicale.
PREVOST	Chimie organique.

Agrégé libre

M. GIRARDET, *, I ☉ Chimie et Toxicologie. |

Chargés de cours

MM.

PREVOST	Chimie minérale et Minéralogie.
GRELOT, *, I ☉, ☉	Hydrologie.
PASTUREAU, O *, I ☉	Chimie biologique.
DONZELOT	Physique.
VERNIER, I ☉	Zoologie.
RENARD, I ☉	Législation et Déontologie.
GILLOT, I ☉, ☉	Pharmacotechnie.
CORDEBARD, †, I ☉	Analyse chimique.
SEYOT, *, †, I ☉, ☉	Hygiène.

Chefs de travaux

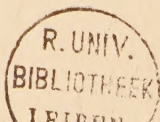
MM.

VERNIER, I ☉	Microbiologie et Parasitologie.
MEUNIER	Pharmacie.
CORDEBARD, †, I ☉	Chimie et Analyse chimique.
STEIMETZ	Micrographie.
DONZELOT (chargé de travaux) ..	Physique.
DIVOUX (chargé de travaux) ..	Chimie biologique et Toxicologie.

Secrétariat

M. E. TRIBOLET, I ☉ Secrétaire. |

La Faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propre à leurs auteurs et qu'elle n'entend ni les approuver ni les imputer.



A MON MAÎTRE,

M. le Professeur LASSEUR.

A MON PÈRE ET A MA MÈRE,

Témoignage d'affectueuse reconnaissance.

INTRODUCTION

En 1915, notre Maître, M. le Professeur LASSEUR, isolait de l'eau d'un puits d'Essey, commune voisine de Nancy, une bactérie qui avait la propriété de donner naissance à un pigment rouge, sur certains milieux de culture et dans des conditions déterminées.

Ce germe, dénommé *Bacille rouge d'Essey* (LASSEUR), a été utilisé, au Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy, dans maintes recherches de Bactériologie générale. Il n'a toutefois jamais fait l'objet d'une description particulière.

M. le Professeur LASSEUR nous ayant proposé l'étude de cette Bactérie, nous en avons précisé les caractères morphologiques et culturels. Au cours de notre travail, nous avons été amené à comparer cette espèce avec les germes chromogènes à pigment rouge. *Serratia marcescens* BIZIO (*B. prodigiosus* FLUGGE) et *Serratia kiliensis* COMITE S. B. A. (1) (*Bacterium h* BREUNIG) nous apparurent comme étant les seules espèces susceptibles d'être rapprochées du *Bacille rouge d'Essey*.

Après en avoir fixé la dénomination, conformément aux

(1) Comité de la Société des Bactériologistes Américains.

règles de la Nomenclature, nous avons entrepris l'étude comparative de *S. marcescens*, *S. kiliensis* et du *Bacille rouge d'Essey* (*S. esseyana* COMBE), au point de vue bibliographique puis expérimental.

En première partie nous exposons le résumé de nos recherches bibliographiques

Viennent ensuite nos résultats expérimentaux qui nous permettent de dire que le *Bacille rouge d'Essey* peut être considéré comme une espèce nouvelle, car il possède suffisamment de caractères le distinguant d'avec les espèces voisines.

La troisième partie de ce travail est une contribution à l'étude de l'influence du fer dans la formation de la prodigiosine (pigment rouge secrété par *S. marcescens*). Le mécanisme de l'action de l'élément fer sur la chromogénèse des Bactéries paraissait établi, d'une part par les travaux personnels de LASSEUR (1911) et ceux effectués en collaboration avec THIRY (1911), BROCQUIN-LACOMBE (1913), NEPVEUX (1920), VERNIER (1924), PALGEN (1925), THIRY et DUPAIX (1930), d'autre part par les recherches de BORTELS (1927), quand un fait nouveau nous fournit l'occasion de revenir sur cette question.

Il nous arriva, par mégarde, de renverser un tube de culture de *S. marcescens* en milieu synthétique L¹, où aucune trace de prodigiosine ne s'était formée par suite de manque de fer (1). Ce tube fut redressé et marqué

(1) Nous avons volontairement supprimé le fer de la composition du milieu synthétique L¹ de LASSEUR. On sait que ce

d'une croix pour le reconnaître. Or, le lendemain, le coton qui bouchait ce tube était devenu rouge sur une grande surface, alors que le liquide de culture était resté incolore.

L'importance de ce phénomène nous serait sans doute restée inaperçue si notre Maître, M. le Professeur LASSEUR, n'avait su découvrir dans ce fait, la possibilité d'éclaircir le mécanisme de l'action du fer dans la chromogénèse bactérienne. Nous verrons comment une série d'expériences, ayant pour point de départ le rougissement du coton, dont nous venons de parler, nous permet d'ajouter de nouveaux arguments en faveur de l'hypothèse de LASSEUR suivant laquelle le fer agit comme vecteur d'oxygène et non pas comme métal.

Avant de commencer l'exposé de nos résultats, nous tenons à remercier tous ceux qui, de quelque manière que ce soit, nous ont facilité nos recherches.

Que notre Maître, M. le Professeur LASSEUR, veuille bien trouver ici l'expression de notre profonde gratitude. Nous ne saurions oublier les nombreuses marques de sympathie qu'il nous a toujours prodiguées. Il n'a pas craint de sacrifier son temps si précieux pour nous donner les conseils éclairés auxquels, tant pour l'expérimentation que pour la rédaction, ce modeste travail doit son existence. Nous le remercions sincèrement.

Qu'il nous soit en outre permis d'associer nos sentiments d'estime et d'admiration pour celui qui nous a si magis-

milieu L¹ normal est très favorable à la formation de la prodigiosine.

tralement enseigné la Microbiologie, à ceux qui lui sont manifestés tous les jours par les Savants français et étrangers. (1)

Nos remerciements s'adressent également à :

M. le Doyen SEYOT auprès de qui nous avons toujours trouvé le meilleur accueil;

M. le Docteur VERNIER qui n'a cessé de nous prodiguer ses conseils éclairés et nous a rendu, avec son amabilité coutumière, d'inappréciables services;

M. le Professeur GILLOT qui a bien voulu nous faire l'honneur de juger ce travail;

Tous nos camarades de Laboratoire qui, spontanément, nous ont fait bénéficier de leur expérience personnelle. Nous citerons spécialement M^{lle} A. DUPAIX et G. MARCHAL;

Nos amis V. FRANÇOIS et R. GUIR à qui nous devons la traduction de divers travaux allemands consultés;

M. A. SACHETTI, aide de laboratoire précieux et serviable.

(1) Nous vous appris avec grand plaisir que l'Académie des Sciences avait décerné à M. le Professeur LASSEUR et à Melle. DUPAIX un prix MONTYON. Cette juste récompense vient s'ajouter au long palmarès dont s'honore le Laboratoire de Microbiologie de Nancy, organisé et dirigé par notre Maître,

CHAPITRE PRÉLIMINAIRE

Nomenclature et Synonymie

CHAPITRE PRELIMINAIRE

MOMENCLATURE ET SYNONYMIE

Au début de ce travail, il nous a semblé nécessaire de fixer, une fois pour toutes, les termes sous lesquels nous désignerons les trois germes dont nous allons parler. Deux d'entre eux possèdent plusieurs synonymes dont la connaissance était nécessaire pour mener à bien la partie bibliographique de nos recherches. Nous allons les indiquer puis, nous conformant aux règles de la Nomenclature et en accord avec les Savants les plus autorisés, nous choisirons pour chaque germe le nom qui, à notre avis, lui convient le mieux et que nous emploierons par la suite.

A. — Nomenclature et synonymie de *Serratia marcescens* BIZIO (*Bacillus prodigiosus* FLÜGGE)

Ce germe possède une synonymie importante. La multiplicité des travaux qui s'y rapportent et les difficultés qu'ont eues les premiers chercheurs à se communiquer

les résultats de leurs investigations (1), semblent en être la cause. Le remaniement des classifications, exigé par le progrès des Sciences naturelles, n'y est peut-être pas étranger. Voici la liste que nous avons pu établir :

- Serratia marcescens* BIZIO 1823.
Zaogalactina imetrophia SETTE 1824.
Protococcus imetrophus MENEGHINI 1836.
Monas prodigiosa EHRENBERG 1849.
Palmella prodigiosa MONTAGNE 1853.
Micraloa prodigiosa ZANARDINI 1863.
Bacteridium prodigiosum SCHRÖTTER 1872.
Micrococcus prodigosus COHN 1872.
Micrococcus imetrophus TREVISAN 1879.
Bacillus prodigosus FLÜGGE, 1886.
Bacillus imetrophus TREVISAN 1887.
Bacillus marcescens DE TONI et TREVISAN 1889.
Bacterium prodigosum LEHMANN et NEUMANN 1896.
Liquidobacterium prodigosum ORLA-JENSEN 1909.
Erythrobacillus prodigosus WINSLOW et al. 1920.

Quel est parmi ces noms celui que nous devons conserver ? La logique et la probité nous indiquent le premier en date mais cependant, nous ne pouvons l'accepter que s'il est conforme aux données de la systématique actuelle.

Au sujet de la valeur du nom générique *Serratia*, VUILLEMIN (1913), dont l'autorité scientifique n'est pas

(1) Aujord'hui encore certaines publications sont pour ainsi dire inaccessibles.

contestée, écrit : « *B. Bizio 1823* créa le genre *Serratia* sur une espèce *Serratia marcescens*... Les caractères reconnus sont sans valeur générique et le genre *Serratia* serait à rejeter s'il existait un nom générique valable pour tous les bâtonnets pourvus de fouets moteurs diffus sur toute la périphérie... Nous sommes donc conduits à maintenir le genre *Serratia* dans la systématique pour éviter un néologisme ».

Dans sa classification VUILLEMIN remplace le terme peu précis de Bactéries (O. F. MÜLLER) par le terme de Schizomycètes (NAEGELI) dont il donne une définition nette au double point de vue de la structure et de la multiplication par scissiparité. Il place les Schizomycètes au-dessous de la bifurcation des règnes animal et végétal, à la base des protistes, et les divise en trois groupes : 1° plastides arrondis; 2° plastides en bâtonnets; 3° plastides sinueux. Le genre *Serratia* fait partie de la seconde catégorie avec cette définition : « *Serratia (genre) = plastides en bâtonnets, pas d'éléments sporifères distincts des bâtonnets végétatifs, fouets diffus (Bacterium, fouets polaires) »*.

Nous verrons dans la suite que *S. marcescens* possède les caractères de ce genre.

En 1913, BUCHANAN adopte les conclusions de VUILLEMIN mais, sept ans plus tard, le « Comité de la Société des Bactériologistes Américains » propose l'emploi de *Erythrobacillus* (FORTINEAU 1905) pour désigner les bâtonnets à pigment rouge, avec *Erythrobacillus prodigiosus* comme espèce type.

En 1923, la classification américaine, parue dans le « *Bergey's manual of determinative Bacteriology* », reprenait le genre *Serratia* avec cette définition: « *petits bâtonnets aérobies produisant un pigment rouge ou rose sur agar et sur gélatine* ».

Le nom spécifique *marcescens* est conservé aussi bien dans la classification de VUILLEMIN que dans celle des Américains.

Sans prendre parti pour l'une ou l'autre de ces classifications, ce qui est chose délicate, nous voyons qu'il est bon de retenir l'appellation de BIZIO: *Serratia marcescens*. Toutefois, la dénomination de FLÜGGE: *Bacillus prodigiosus*, étant la plus connue, nous la rappellerons de temps en temps.

B. — Nomenclature et synonymie
de *Serratia kiliensis* Comité S. B. A.
(*Bacterium h* BREUNIG)

Ce germe a été étudié pour la première fois par BREUNIG (1888) qui le nomma simplement *Bacterium h*.

En 1890, LAURENT, qui l'étudiait au point de vue de la variabilité, le nomma *Bacille rouge de Kiel*.

Dans la littérature scientifique on trouve encore les noms: *Bacillus kiliensis*, *Bacterium kiliense*, *Bacillus ruber balticus*.

Le « *Bergey's manual of determinative Bacteriology* » donne le terme *Serratia keilensis*.

Puisque ce germe possède les caractères du genre *Serratia*, au sens de VUILLEMIN et au sens des Américains, nous rectifierons l'orthographe indiquée précédemment et nous conserverons le terme *Serratia kiliensis* (Comité S. B. A.).

**C. — Nomenclature et synonymie
de *Serratia esseyana* n. sp. COMBE
(*Bacille rouge d'Essey* LASSEUR)**

Nous avons vu que cette Bactérie a été isolée par M. le Professeur LASSEUR à Essey en 1915. Dans les différentes publications du Laboratoire de Microbiologie de Nancy elle figure sous le nom de *Bacille rouge d'Essey* (LASSEUR). Ayant pu vérifier que cette espèce était nouvelle et qu'elle possédait les caractères du genre *Serratia* nous l'avons nommée *Serratia esseyana* (1).

En résumé les trois germes que nous allons étudier sont :

- 1° *Serratia marcescens* BIZIO 1823.
- 2° *Serratia kiliensis* Comité S. B. A. 1923.
- 3° *Serratia esseyana* COMBE 1933.

(1) Le mot *esseyana*, qui rappelle l'origine du germe, nous a été conseillé par M. le Professeur GAFFIOT, de la Faculté des Lettres de Besançon. Nous l'en remercions ainsi que M. le Professeur FRIEDEL de la Faculté des Sciences de Nancy, qui a bien voulu vérifier que le terme choisi était conforme aux règles de la Nomenclature.

PREMIÈRE PARTIE

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

de

Serratia marcescens BIZIO, 1823
(*Bacillus prodigiosus* FLÜGGE)

et de

Serratia kiliensis COMITE S. B. A., 1913
(*Bacterium h* BREUNIG)

CHAPITRE I

HISTORIQUE

Des deux Bactéries envisagées dans cette première partie, seule *Serratia marcescens* Bizio (*B. prodigiosus* FLÜGGE) présente un intérêt historique.

Ce germe apparaît, suivant le milieu, l'âge et le pH de ses cultures, tantôt sous la forme d'un Microcoque, tantôt sous la forme d'un court Bacille dont on peut facilement percevoir la motilité. Coloré selon la méthode de GRAM, il est décoloré en quelques secondes par l'alcool; il ne donne pas de spores et croît rapidement sur la plupart des milieux usuels, à la température du laboratoire. Il liquéfie la gélatine; enfin, propriété qui motive l'histoire qui suit, s'il estensemencé dans des conditions favorables sur des matières amylacées, il les recouvre en peu de temps d'une magnifique coloration rouge sang.

Ce phénomène, dont les premières explications scientifiques ne datent que du début du XIX^e siècle, devait frapper l'imagination populaire. C'est ainsi que l'histoire nous parle, à plusieurs reprises, de taches de sang qui apparurent sur des matières alimentaires, dans des con-

ditions très mystérieuses, et provoquèrent de véritables perturbations. Avait-on toujours affaire au même germe ? Les premières descriptions de ces apparitions manquent de détails et ne nous permettent pas de conclure. En dehors de *Serratia marcescens* il n'est pas rare de trouver, dans l'air et dans l'eau, différentes Bactéries à pigment rouge. Ceci laisse supposer que l'exposé, que nous allons donner, se rapporte vraisemblablement à plusieurs espèces du même groupe.

L'histoire ancienne nous apprend que les Pythagoriciens ne devaient pas manger de Haricots. La raison de cette défense, nous la trouvons dans un des dialogues de LUCIEN (II^e siècle avant J.-C.). Cet historien attribue à PYTHAGORE les paroles suivantes : « *Les Haricots blancs cuits se transforment en sang quand ils ont été exposés un moment au clair de lune* ». Pour la même raison, certaines sectes des temps anciens, comme les prêtres de Zoroastre, ne pouvaient consommer ce légume.

En 332 avant J.-C., ALEXANDRE LE GRAND, roi de Macédoine, mène à bien la prise de Tyr, en grande partie grâce au *miracle du sang*. Ses soldats étaient alors terrifiés par l'apparition de taches rouges sur leur pain de munition. Le prêtre ARISTANDER, chargé d'expliquer ce présage, fut assez inspiré pour calmer les soldats et leur rendre courage par l'explication suivante : « *Le pain rougit dans sa masse et non pas en surface, ceci veut dire qu'un destin sanglant est destiné à ceux qui se trouvent dans la cité et pas à ceux qui en font le siège* ». (CURTIUS RUFUS, hist. Alexandri II). D'après SCHEURLÉN

(1896), le germe en cause ici serait plutôt *Oïdium aurantiacum* que l'on identifia dans les épidémies de taches rouges de Paris (1843) et Alger (1847). Il est peu probable que *S. marcescens* ait pu se développer à l'intérieur d'un pain aigre comme l'était celui que les soldats utilisaient pour leurs vivres.

L'année 332 avant J.-C. ayant été marquée, non seulement par l'apparition de taches rouges, mais encore par la peste, 170 *matrones* auraient été exécutées à Rome sous l'inculpation d'empoisonnement prémédité du peuple. SCHEURLÉN, qui est remonté aux sources (*Livius Historiae*, livre 8, chap. 18), d'ailleurs peu claires, n'attache pas, à juste raison, un caractère bien authentique à cette anecdote.

Au Moyen-Age, le phénomène de l'*Hostie saignante* était considéré comme un miracle de transsubstantiation. Une apparition de ce genre eut lieu à Wilsnack le 16 août 1383. Sur l'autel de l'église détruite par un incendie, il était resté des hosties. Or, après huit jours de pluie, ces hosties s'étaient recouvertes de *sang*; elles furent remplacées par d'autres hosties intactes qui subirent le même sort. L'opinion populaire fut que ces hosties avaient été percées par des Juifs et saignaient par suite de cette blessure. Un châtement s'imposait et les auteurs présumés furent tués ou brûlés. Cette croyance fut la cause d'un grand nombre de meurtres signalés à plusieurs endroits où eurent lieu de semblables apparitions. Il convient de signaler, à ce sujet, que les hosties, par leur composition, riche en amidon et pauvre en acide, consti-

tuent un bon milieu de culture pour *S. marcescens*. EHRENBURG n'a-t-il pas dit, non sans quelque exagération : « *Serratia marcescens, quoique simple saprophyte, a tué plus de gens que maint Bacille pathogène* ».

Après quelques apparitions de peu d'importance, il faut arriver en 1819 pour connaître une véritable épidémie de tâches rouges, au cours de laquelle furent données les premières explications du phénomène.

Au mois de juillet, à Legnaro, village voisin de Padoue, en Italie, de la *polenta* (farine de maïs bouillie), mise en réserve dans un buffet chez un nommé Antonio Pittarello, s'était recouverte de tache rouges ressemblant à du sang. L'épidémie ne tardait pas à se répandre dans le district de Piove et atteignait Padoue et ses environs à la fin d'août. Ce fait ne manqua de déclencher une véritable perturbation parmi les paysans ignorants et superstitieux qui considéraient le phénomène comme d'origine diabolique et l'appelaient la *Polenta saignante*. Ils ne voulaient plus vivre sous un toit où agissaient de telles influences. Les familles habitant les maisons où le phénomène apparaissait, étaient l'objet de calomnies. Le trouble devint si grand qu'il fut nécessaire de demander le secours de la police départementale qui désigna une commission chargée d'enquêter. Celle-ci fut composée de professeurs de l'Université de Padoue. D'autres chercheurs, tels que Bartolomeo Bizio, étudièrent le phénomène d'une façon indépendante. Il nous est agréable de signaler que Bizio était alors jeune pharmacien; son nom a donc sa place dans la liste de ceux, déjà nom-

breux, qui ont contribué et contribuent à la gloire de notre profession.

La première explication naturelle de la *polenta saignante* parut dans la *Gazette Officielle de Venise* en 1819, mais sans signature, et fut revendiquée par BIZIO en 1823, 1827 et 1844. Le Dr Vincenzo SETTE, physicien et chirurgien de Piove, qui accompagnait la *Commission Officielle* à Legnaro, conclut, comme BIZIO, à une contamination naturelle. Pietro MELO, directeur du jardin botanique de Saonara, déclara que le phénomène était dû à une *fermentation spontanée* de la *polenta* qui se transformait en mucilage coloré.

Pour résoudre la question de priorité dans l'explication scientifique de la *polenta saignante*, examinons les premiers documents ou du moins les extraits que nous avons pu connaître grâce à la publication de BREED R. S. et BREED M. E. (1924) qui ont eu la faveur de pouvoir consulter les rapports originaux de BIZIO et de SETTE.

La note de MELO parut la première, mais manque d'intérêt puisqu'elle assimile le phénomène à une simple *fermentation* (qui à ce moment excluait toute action vitale). Elle fut néanmoins vivement attaquée par BIZIO, en particulier dans la lettre que celui-ci adressait à Angelo BELLANI (MERLINO 1924). BIZIO critique les expériences sur lesquelles s'appuyait MELO et, dans ses recherches, il suit la méthode SPALLANZANI. On le voit se mettre en garde contre les erreurs pouvant être provoquées par l'apport de germes restés sur ses mains lorsqu'il maniait les *polentas* rouges. Il découvrit la contamination par contact

et voulut se rendre compte si celle-ci pouvait se produire à distance. Dans une sphère de verre il suspendit, au centre, un morceau de *polenta* rouge; par de petites ouvertures il put fixer des morceaux de *polenta* fraîchement préparée, de telle sorte que ceux-ci se trouvaient, au dessus, au dessous, à gauche et à droite, à une même distance du centre. En *quelques heures*, la coloration rouge se manifesta, à un même degré, dans toutes les directions. Cette influence puissante de la *polenta* ne lui parut pas assimilable à une fermentation. Cette expérience et d'autres l'amènèrent à penser que la cause du phénomène devait être un organisme vivant.

Bizio avait-il affaire à un végétal ou à un animal ? Pour le savoir il fit plusieurs expériences dont la suivante est la principale: il fixa au centre d'un ballon de verre un morceau de *polenta* rouge; un thermomètre, dont le réservoir était très voisin de la *polenta*, indiquait la température. Le ballon étant chauffé au bain de sable, une température de 120° R. fut suffisante pour tuer tous les germes en cinq minutes. Voici les conclusions de Bizio: « *Je répétai plusieurs fois les mêmes expériences avec les mêmes résultats. Cette substance obéit aux lois que Spallanzani a données pour les végétaux. J'en conclus que la matière rouge, quoique faisant partie des plus petits, est néanmoins un végétal* ».

Dans quelle classe Bizio va-t-il ranger ce végétal ? : « *Je suis incliné à le ranger dans les fungi puisqu'il possède toutes les caractéristiques de ces plantes* ». N'ayant pas trouvé de genre auquel le rattacher dans la

classification de BULLIARD et PERSOON, il se vit dans l'obligation de créer un genre qu'il nomma *Serratia* en l'honneur de Serafino SERRATI, physicien italien qui, le premier, fit naviguer un bateau à vapeur sur l'Arno. Voici la description donnée par BIZIO: *Serratia, funguli acaules, semispherici, capsulis confertis. Serratia marcescens, vesicula tenuissima latice primo roseo dehinc rubro repleta.*

BIZIO signale que le pigment de *S. marcescens* est soluble dans l'alcool et pas dans l'eau, à la température ordinaire. La soie peut être teinte avec ce colorant mais, malgré les mordants, la coloration disparaît vite sous l'influence de la lumière.

Revenant sur son travail, BIZIO publia en 1827, dans ses « *Opusculi chimico-physici* » quelques commentaires sur les recherches de SETTE.

Le mémoire de ce dernier fut présenté devant l'Atheneum de Treviso le 28 avril 1820. SETTE était médecin du district de Piove. Il fut appelé pour éclaircir le phénomène dans lequel le peuple voyait une punition de Dieu. Pour prouver aux paysans que les maisons où se produisait la *polenta saignante* n'étaient pas hantées, il fit rougir de la *polenta* dans la maison même du curé. Ceci contribua fortement à ramener le calme. SETTE fit quelques remarques sur les conditions qui facilitaient l'évolution de l'épidémie; par exemple la propreté plutôt douteuse et l'humidité qui régnaient dans la cuisine de PITTARELLO. SETTE cultiva *S. marcescens* sur d'autres milieux que la *polenta* tels que de la viande crue ou bouil-

lie, de la farine de blé, de la bouillie d'amidon, de la soupe au riz et des quartiers de Poire. Le pigment se formait de 16 à 20° R., avec une humidité de 50 à 60° de l'hygromètre de BELLANI. Le microscope, dont SETTE se servait, ne lui permit pas de préciser la nature des taches rouges. Il donna la description suivante :

Genus Zaogalactina. Car. Receptaculum nullum, substantia gelatinosa similis, forma constanti, generatio obscura.

Species Zaogalactina imetropha. Car. granuliformis, minima, gregaris, sessilis, intense punicea.

Il reste à préciser les dates de publication des deux descriptions précédentes. Le rapport (1) où figure la description de SETTE ne parut pas avant 1824. D'autre part, le travail complet du même auteur fut publié à Venise, la même année, sans qu'on puisse dire s'il est antérieur au rapport de MALTEO. La première publication signée de BIZIO est de 1823; la priorité en est donc indiscutable, d'autant plus qu'en 1819 le même chercheur avait fait paraître une note sur *S. marcescens*, sans toutefois la signer, mais dont il devait revendiquer la paternité en 1823.

De 1820 à 1824 on signale quelques apparitions de taches rouges dans la province de Padoue mais celles-ci ne furent pas très importantes.

En 1821, au moulin GERHARDT, près de Enkirch, dans

(1) p. 37 du rapport établi par F. MALTEO, secrétaire de la Société.

la vallée de la Moselle, les habitants constatèrent un rougissement de tous leurs aliments du 22 août au 14 septembre. Le médecin de l'endroit, qui ignorait l'épidémie de Padoue, fit quelques recherches mais sans résultat.

En 1844, BIZIO revendiquait son droit de priorité dans les Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris dans ces termes : « *Dans le n° 1 du Journal de Pharmacie de Janvier 1844, j'ai lu l'extrait d'un Rapport adressé au Ministre de la Guerre sur une altération extraordinaire du pain de munition, Rapport fait par une Commission dans laquelle entraient plusieurs membres de l'Académie des Sciences, M. Dumas, Pelouze et Payen. Si le fait a paru digne d'intérêt, il me sera permis de faire remarquer que je m'en suis déjà occupé il y a vingt-quatre ans et que j'en ai fait l'objet d'une étude attentive* ».

Après celles de BIZIO et celles de SETTE nous arrivons aux recherches effectuées par EHRENBURG qui étudia les taches rouges formées sur des Pommes de terre cuites (dans une maison de Berlin où il y avait eu un cas mortel de choléra). Dans un travail publié en 1848, EHRENBURG, qui ignorait les recherches de BIZIO (1), grâce aux progrès faits à cette époque dans la fabrication des microscopes, put mettre en évidence la morphologie de *S. marcescens* qu'il rangea dans le règne animal, à cause de sa motilité. L'examen des taches rouges lui montra un très

(1) EHRENBURG prit plus tard connaissance du travail de SETTE mais ignora toujours celui de BIZIO.

grand nombre d'animalicules ovales et isolés. Il crut apercevoir un unique fouet polaire dans des préparations desséchées. Ces considérations l'amènèrent à changer l'appellation de SETTE et il nomma son germe : *Monas prodigiosa*. Il le décrivit comme suit : « *Monas prodigiosa* (*Mucor sanguineus* de Col, *Zaogalactina imetropa* Sette) corpusculis 1/300-1/800 lineae longis, proboscide brevior corpore. In cibis humilis interdum copiosae sanguineas maculas gelatinosas efficiunt. In pollice cubico uno 46,656,000,000,000 ad 648,736,000,000,000 vivunt. Habitat in Syria et in Europa ».

La place assignée à *S. marcescens*, par EHRENBURG, fut contestée en 1855 par MONTAGNE qui étudiait alors des taches rouges formées sur du poulet cuit. Il considérait le germe comme une Algue du genre *Palmella* et le nomma *Palmella prodigiosa*. Avec un grossissement de 1200 diamètres, il ne put apercevoir le *flagellum* signalé par EHRENBURG et la motilité lui parut être due au mouvement brownien, particulièrement important pour un être si petit.

Puis viennent les études de ERDMANN (1866), COHN (1870), SCHRÖTTER (1872), etc. Avec les progrès incessants de la technique bactériologique le germe coupable de la *polenta saignante* est étudié d'une manière approfondie.

Le désarroi jeté par un germe aussi petit que *S. marcescens* au XIX^e siècle, nous rappelle le trouble que la notion de formes filtrantes a suscité dans certains milieux. Mais même si cette dernière notion se vérifiait elle ne modifierait en rien le cadre de la Microbiologie générale.

Par contre, la « *nécessité d'une collaboration étroite des sciences exactes pour l'étude des problèmes biologiques s'affirme de jours en jours* » (LECOMTE DU NOUY, 1931); « *cette collaboration scientifique réside dans la division du travail qui s'introduit de plus en plus en Biologie entre l'expérimentateur et le théoricien* » (LASSEUR, 1931).

CHAPITRE II

HABITAT

S. marcescens BIZIO (*B. prodigiosus* FLÜGGE) est un germe assez répandu dans la nature. On a pu l'isoler souvent de l'air et de l'eau, éléments qui contribuent à sa dissémination. Ceci explique qu'il ait été signalé sur de la *polenta* (BIZIO, 1819), dans le lait de Vache et de Chèvre (LUX, 1903), sur des matières alimentaires. Plusieurs auteurs ont relaté l'apparition de taches rouges sur du caoutchouc brut, sans toutefois être d'accord sur la cause de ces taches. CARUTHERS (1) les attribue à une sorte de *Syncephalis* et RIDLEY (1) au *Protococcus nivalis*. ARENSE (1912), qui avait reçu des chutes de caoutchouc préparé de Manihot, recouvertes de taches rouges, put en isoler *S. marcescens*. D'après lui, ce germe aurait causé d'assez grands dommages dans les ateliers de séchage du caoutchouc. Il propose comme remède un badigeonnage avec une solution de formol à 40 %.

S. kiliensis a été isolé de l'eau. Sa présence y a toutefois rarement été signalée.

(1) In ARENSE 1912.

CHAPITRE III

MORPHOLOGIE

Les premiers Bactériologistes étaient avant tout des Naturalistes. Quelques-uns d'entre eux avaient eu, cependant, leur attention attirée par les propriétés infectieuses des germes. Malgré les constatations de PASTEUR (1860), montrant que la spécificité des micro-organismes ne résidait pas dans leur forme, mais plutôt dans leurs aptitudes fonctionnelles, les Bactériologistes ont toujours accordé une grande importance à l'étude de la forme des Bactéries. Cette orientation vers la morphologie devait conduire à la création des Ecoles de COHN (monomorphisme) et de NAEGELI (polymorphisme). Cette dernière allait porter un préjudice considérable à la notion d'espèce qu'elle niait. Ces divergences d'idées auraient pu être aplanies, en partie, si, à cette époque, on avait eu davantage de notions sur les cultures et sur le rôle du temps et des milieux nutritifs comme facteurs influençant la forme des plastides.

Quoiqu'il en soit, l'examen microscopique d'une culture bactérienne normale montre des plastides de tailles très différentes, dont la succession des formes correspond à

des stades successifs des cycles évolutifs décrits par LASSEUR en 1911.

Ainsi s'expliquent les différentes descriptions d'un même germe données par des observateurs qui travaillaient sur des cultures effectuées dans des conditions dissemblables.

A. — Morphologie de *S. marcescens* BIZIO

(*B. prodigiosus* FLÜGGE)

a) Forme de *S. marcescens*

Passons sur les descriptions de BIZIO et de SETTE, que nous avons déjà données, et qui n'ont qu'un intérêt historique, pour arriver à celles plus détaillées d'EHRENBERG (1849), FLÜGGE (1886), SCHOTTELIUS (1887) et NAKANISHI (1901).

Pour EHRENBERG, *S. marcescens* se présente sous la forme de corpuscules de 1/8000 à 1/3000 de ligne de de long (1), ovoïdes, munis d'un fouet plus court que le corps.

Voici d'après FLÜGGE la description de *S. marcescens* : cellules ellipsoïdes d'environ 1 μ de long. Avant la division ces éléments possèdent nettement la forme de bâtonnets; quelquefois on observe la formation de filaments. Les cellules courtes et ovoïdes prédominent après une multiplication rapide; cependant, avec un fort grossis-

(1) 1/8000 à 1/3000 de ligne = 0 μ 28 à 0 μ 75.

sement, on voit qu'il ne s'agit là, ni d'ellipses, ni de cercles, mais de rectangles à extrémités arrondies.

Pour SCHOTTELIUS, ce sont de petits bâtonnets à peine plus longs que larges, affectant souvent des formes anormales, en massues, en fuseaux. Parfois apparaissent des cellules renflées qui ressemblent à de la levure de bière dégénérée.

NAKANISHI est le seul auteur qui parle de noyau. D'après lui les formes sphériques se trouveraient seules dans les cultures de deux jours sur agar. Les individus courts auraient un noyau rond, tandis que les formes plus longues, bâtonnets et biscuits, auraient un noyau étranglé ou bien deux noyaux. La membrane serait souvent très nette.

b) Influences capables de modifier la forme
de *S. marcescens*

De nombreuses expériences ont montré que différents facteurs étaient capables de modifier la forme des Bactéries. Sans rappeler toutes les tentatives qui ont été faites dans cet ordre d'idée, nous citerons les travaux relatifs à l'action de l'âge, de la réaction des cultures, de la présence de certains sels dans les milieux nutritifs.

En ce qui concerne l'action de l'âge de la culture, WASSERZUG (1888) a remarqué la présence de formes anormales dans les vieilles cultures sur Pomme de terre. Tout en restant sphériques, certaines cellules grossissent pour atteindre un diamètre de 1 μ à 2 μ , d'autres se

renflent pour devenir de gros bâtonnets ou prendre la forme de Levures. Cette action de l'âge est probablement imputable à des modifications apportées dans le milieu par la vie même des germes.

L'importance de la *réaction du milieu de culture* nous est signalée par WASSERZUG (1888) lorsqu'il écrit: « *Pre-nons par exemple du bouillon de veau auquel on a ajouté une quantité d'acide tartrique relativement considérable pour M. prodigiosus (S. marcescens), une dose de 4 à 5 décigrammes par litre. Ensemençons le avec une trace de culture provenant d'une colonie bien isolée sur gélose. Au lieu de se faire en abondance dans les 24 heures, le développement est alors retardé de 3 à 5 jours, et, quand il s'est produit, l'examen montre un changement considérable dans la forme des cellules. Au lieu de microcoques isolés et sphériques, on ne trouve plus que des bâtonnets de grandeur très diverse. Les uns sont isolés, épais et ont de 2 à 5 μ de long; le plus souvent ils sont réunis en un filament qui peut être composé de 2 à 20 articles et davantage, séparés les uns des autres par un espace clair dû à la présence d'une matière gélatineuse qui entoure abondamment chacun des bacilles; ailleurs cette matière gélatineuse disparaît presque complètement et les bacilles s'allongent beaucoup de manière à se toucher et même à former un long filament continu qui s'enroule plusieurs fois sur lui-même. Toutes les formes de passage existent entre ce filament très allongé et le bacille court isolé* ». Si la réaction du milieu redevient alcaline on retrouve « *la forme microcoque proprement dite, qui*

semble être ainsi la forme définitive de l'organisme ».

JAROSLAV PEKLO (1910), examinant des cultures sur gélose, où il faisait varier la **concentration en NaCl**, constatait les faits suivants :

1° Si la concentration en NaCl était de 5 à 6 %, les éléments de la culture étaient composés d'un mélange de bâtonnets, soit très minces, soit très gros, de formes en Poire, en Spirilles ou en aiguilles.

2° A 8,5 % en NaCl, les bâtonnets étaient extraordinairement gros et longs, mêlés à des filaments.

3° Enfin, si le milieu contenait 10,5 % de NaCl, il ne restait que des bâtonnets de forme irrégulière et des Bacilles courts.

Nous venons de voir que certains corps chimiques influencent la morphologie bactérienne quand ils existent en quantités notable dans les milieux de culture; d'autres, au contraire, agissent quand ils sont à l'état de traces. BORTELS (1927) a remarqué que *S. marcescens* se présentait sous la forme de bâtonnets courts dans les milieux dépourvus de fer et sous la forme d'un mélange de bâtonnets courts et de filaments dans le même milieu synthétique contenant des traces de fer; si au fer on ajoute des traces de magnésium on peut constater une forte autolyse.

c) Dimensions de *S. marcescens*

Les dimensions données par les différents auteurs ne semblent pas résulter de mesures faites suivant des pro-

cédés très précis. Dans ces études on cherche en vain des indications sur la méthode suivie, l'âge et l'origine des cultures, facteurs de la plus haute importance. Le travail de notre camarade ROLIN (1929) faisant exception à cet égard, nous nous sommes rapporté aux mesures établies par lui. Cette question sera traitée plus complètement dans la seconde partie de ce travail. Nous nous contenterons, ici, de donner au lecteur une idée des dimensions de *S. marcescens*, par ce petit tableau :

Culture de *S. marcescens* âgée de deux jours, effectuée à la température du laboratoire. Préparations colorées à la fuschine formolée et examinées entre lame et lamelle.

Fréquence maxima observée	Dimensions correspondantes	Rapport $\frac{L}{l}$ correspondant	Variations de $\frac{L}{l}$ et de $\frac{l}{L}$
9 %	$L = 1 \mu 5$ $l = 0 \mu 5$	1.8	$1 \mu 3 < L < 2 \mu 3$ $4,3 < \frac{L}{l} < 3,2$ $\frac{1}{1}$

L = longueur de la plastide. l = largeur.

Nota. — Les variations du rapport de LASSEUR $L : l$ permettent de se rendre compte de l'allongement ou du raccourcissement de la plastide.

d) Motilité de *S. marcescens*

MONTAGNE (1852) et SCHRÖTTER (1875) considéraient *S. marcescens* comme immobile. Le premier de ces savants, examinant les germes d'une culture sur du Riz cuit, ne leur trouva qu'un mouvement brownien exagéré, *dû à l'extrême petitesse du germe*. Le second, ayant mis les plastides d'une culture sur Pomme de terre en suspension dans l'eau, les vit immobiles; il constata bien quelques plastides en mouvement mais il les considéra comme des impuretés.

La plupart des bactériologistes qui ont cultivé *S. marcescens* sur des milieux liquides admettent néanmoins sa motilité.

B. — Morphologie de *S. kiliensis* COMITE S. B. A.
(*Bacterium h BREUNIG*)

a) Forme de *S. kiliensis*

BREUNIG (1888) décrit *S. kiliensis* comme étant un Bacille immobile, fortement arrondi, long de 1 μ sur 0,8 μ .

Pour LAURENT (1890) ce germe conserve sur tous les milieux sa forme de bâtonnet.

b) Dimensions de *S. kiliensis*

Les dimensions de *S. kiliensis* faisant l'objet d'un paragraphe de la seconde partie, nous nous bornerons, ici, à donner un résumé des mesures prises par ROLIN (1929):

Culture de *S. kiliensis*, âgée de vingt quatre heures, effectuée sur Pomme de terre, à la température du laboratoire. Préparations colorées à la fuschine formolée et examinées entre lame et lamelle.

Fréquence maxima observée	Dimensions correspondantes	Rapport $\frac{L}{l}$	Variations de L et de $\frac{L}{l}$
8 %	$L = 1 \mu 9$ $l = 0 \mu 6$	3 , 1	$1 \mu 5$ L 4μ 2,1 L 6,6

c) Motilité de *S. kiliensis*

Nous avons vu que BREUNIG considérait *S. kiliensis* comme immobile. Au contraire, LAURENT a reconnu à ce germe un mouvement lent. Cette différence de vue ne peut nous étonner car nous savons que le mouvement des Bactéries ne peut être remarqué que lorsque l'on se place dans des conditions d'observation bien déterminées.

CHAPITRE IV

CARACTÈRES DE CULTURE

Comme le fait remarquer LASSEUR (1913), la morphologie externe des Bactéries ne saurait, à elle seule, permettre de diagnostiquer d'une manière rigoureuse l'espèce, car elle est fonction de trop nombreux facteurs. Il n'est pas besoin d'insister longuement sur le rôle du substratum, de sa réaction, de son degré d'aération, de l'âge de la culture, pour en convaincre le lecteur. L'étude cytologique, étant données les difficultés qu'elle présente, n'offre pas plus de ressource.

La morphologie, tant externe qu'interne, ne constitue qu'un élément de la diagnose. Pour différencier les germes, il faut, en outre, s'adresser aux propriétés culturales. Encore doit-on réunir un certain nombre de caractères suffisamment nets et constants, pour définir l'espèce. L'aspect des cultures sur les divers milieux utilisés couramment dans les laboratoires, le pouvoir fermentatif des glucides, la chromogénèse, l'agglutinabilité par un sérum homologue ou par un sérum hétérologue (pour

fixer les relations phylogénétiques entre espèces), la précipitation par les acides et les ions à charge triple (Fe et Al), le pouvoir pathogène, etc., sont autant d'éléments précieux de différenciation.

Si la morphologie est fonction de nombreux facteurs, il en est de même des caractères de culture. La lumière, la température, la composition de l'atmosphère ambiante et du *substratum*, l'origine et l'âge de la culture sont à citer parmi les éléments qui exercent une action sur la végétation bactérienne. Il apparait donc nécessaire de ne rien décrire sans préciser, dans la mesure du possible, les conditions d'expérience.

Les documents relatifs à la morphologie de *S. marcescens* et de *S. kiliensis* ne sont pas toujours très précis. Nous essaierons de les résumer.

A — *S. marcescens* BIZIO (*B. prodigiosus* FLÜGGE)

I. — CARACTERES GENERAUX DE CULTURE

a) Température optima et température mortelle

Si pour la plupart des auteurs, l'optimum de croissance de *S. marcescens* est aux environs de 25° C., les chiffres donnés pour la température mortelle ne concordent pas toujours.

Ce désaccord peut s'expliquer de différentes façons.

Tout d'abord nous soulignerons l'influence de l'origine de la semence, l'âge de la culture, la nature des milieux utilisés. Ensuite il faut considérer que toutes les plastides d'une suspension bactérienne ne sont pas également sensibles à l'action de la chaleur.

Pour rechercher la température mortelle d'un germe avec quelque précision il faut tenir compte de la nature du liquide dispersif utilisé, de la température de chauffage et de son temps d'action, de la masse chauffée, de la concentration en corps microbiens. Noter la proportion des germes tués après des temps de chauffage différents peut présenter un grand intérêt, mais on se heurte à la difficulté de dénombrer les germes vivants dans une culture. On sait, en effet, qu'en transportant des plastides bactériennes d'un milieu dans un autre, en effectuant des isolements sur plaques de gélose ou de gélatine, on détermine la mort des éléments les moins résistants.

Voici un tableau indiquant les températures mortelles établies par différents auteurs.

Auteurs	Température mortelle
Miquel et Cambier	70° C. environ
Delanoe	45° C.
Wasserzug	56 - 58° C.

Ces chiffres, que nous nous gardons de contester, donnent une idée du désaccord dont nous parlions tout à l'heure et ne peuvent être utilisés car nous ne connaissons pas les conditions d'expériences.

BERTARELLI (1903) a constaté qu'après passage sur l'animal, la température de 80° C. ne serait pas fatale à une culture de *S. marcescens*.

PEJU (1908) s'est occupé spécialement de l'action de la chaleur sur la croissance de *S. marcescens*. Nous résumons dans le tableau suivant les résultats obtenus, par cet auteur, avec des cultures sur agar peptoné :

Températures	Aspect des cultures
27-28° C.	Végétation, mais pas de pigment.
34-38° C.	Culture blanche, mais maigre, seulement dans les tubes maintenus en atmosphère saturée d'eau.
47-46° C.	De toute façon les germes sont définitivement morts.

Une atmosphère saturée d'eau agirait donc sur le développement en reculant la température limite de croissance.

b) Action de la dessiccation

S. marcescens résiste longtemps à l'action de la dessiccation; des cultures, abandonnées pendant plusieurs années dans un endroit sec, ont conservé leur vitalité.

c) Aérobiose

On sait combien l'oxygène de l'air peut agir sur le métabolisme bactérien en modifiant ses divers processus. Des germes tels que *B. chlororaphis*, *B. caryocyaneus* exigent une certaine tension d'oxygène pour produire leur pigment. Le voile formé par les germes du groupe *subtilis-mesentericus*, en milieux liquides, témoigne du besoin d'oxygène qu'ont ces germes pour vivre. En ce qui concerne *S. marcescens* les avis sont partagés. LIBORIUS (1886) le considérait comme un germe anaérobie facultatif, c'est-à-dire pouvant végéter aussi bien en la présence qu'en l'absence d'oxygène libre. SCHOTTELIUS arrivait à la même conclusion, à la suite de cultures faites en atmosphère de gaz carbonique ou d'hydrogène. Cette opinion devait être contestée par SCHEURLÉN (1896), RITTER (1900) et SAMKOW (1904). Ces auteurs, grâce à l'emploi d'appareils perfectionnés, où toute admission d'air était exclue, purent démontrer la vie essentiellement aérobie de *S. marcescens*. Utilisant ce résultat, TEMPÉ (1931) a pu établir une technique de culture des microbes anaérobies.

Se servant de boîtes de PÉTRI spéciales, à fermeture hermétique, il y coule deux couches de gélose, l'une dans le fond, l'autre dans le couvercle ; l'une estensemencée avec *S. marcescens*, l'autre avec le germe anaérobie strict. Un vide parfait d'oxygène s'établit rapidement, qui permet la croissance de l'anaérobie strict.

II. — ASPECT DES CULTURES

Nous envisagerons ici l'aspect des cultures de *S. marcescens* sur les milieux usuels solides et liquides, puis sur les milieux synthétiques liquides. Ces derniers présentent un très gros intérêt en Bactériologie.

LASSEUR (1911), dans un remarquable travail sur *B. chlororaphis* a montré le rôle de traces excessivement faibles de Fe, Cu, Mg sur la chromogénèse. Ces considérations devaient l'amener (1913) à insister sur la nécessité d'utiliser des milieux rigoureusement définis pour mettre en évidence les propriétés chromogènes des Bactéries. Dans cette étude les produits employés doivent être particulièrement purs et les vases de culture aussi inattaquables que possible par les milieux qu'ils contiennent.

a) Milieux solides usuels

Gélatine. — *S. marcescens*ensemencé sur plaques de gélatine donne en vingt quatre heures des petites colonies rondes, granuleuses grisâtres, qui prennent rapidement

une couleur rose puis rouge. Leur contour, d'abord régulier, devient de plus en plus flou par suite d'une liquéfaction de la gélatine. Après plusieurs jours, la colonie est représentée par une masse de corps microbiens au fond d'une cupule.

Dans les tubes de gélatine, ensemencés en pique, l'action protéolytique exercée par *S. marcescens* se traduit par la formation d'un entonnoir de liquéfaction.

Gélose. — Les colonies sur plaques de gélose sont blanches, puis rouges, de forme ronde.

Sérum coagulé. — Le développement de *S. marcescens* est le même sur sérum coagulé que sur gélose, mais moins abondant. Ce milieu subit la liquéfaction.

Pomme de terre. — *S. marcescens* pousse abondamment sur Pomme de terre. La culture est blanche puis rouge et forme rapidement un enduit brillant sur toute la surface du milieu.

b) Milieux liquides usuels

Bouillon et eau peptonée. — *S. marcescens* cultivé sur ces milieux y détermine la formation d'un trouble uniforme du liquide. En outre, un anneau apparaît à la surface libre du liquide, contre la paroi du tube. Cet anneau offre une coloration d'un rouge plus ou moins intense,

Lait. — *S. marcescens* coagule le lait mais le caillot se redissout ensuite. La coagulation est donc suivie d'une peptonisation.

c) Milieux synthétiques

S. marcescens a été cultivé sur différents milieux synthétiques où il détermine un trouble uniforme. Le milieu synthétique L¹ de LASSEUR convient particulièrement à son développement et à la manifestation de son pouvoir chromogène.

III. — MODIFICATIONS APPORTEES
DANS LES MILIEUX DE CULTURE
PAR *S. MARCESCENS*

Une Bactérieensemencée sur un milieu y détermine des modifications au fur et à mesure de son développement. Certaines substances sont transformées pour être assimilées; d'autres sont rejetées à l'état de déchet. C'est ce que nous allons pouvoir constater en résumant les travaux relatifs à l'action de *S. marcescens* sur différents milieux.

a) Liquéfaction de la gélatine

S. marcescens liquéfie la gélatine grâce à un ferment hydrolysant que l'on peut extraire par centrifugation

d'une culture sur bouillon, âgée de trois semaines de préférence (V. GROER 1912).

b) Coagulation du lait

GORINI (1893) avait remarqué la coagulation du lait par *S. marcescens*, sans toutefois donner de détails sur cette action.

WAHLIN (1928) éludia ce fait de façon plus approfondie. Ses conclusions peuvent s'énumérer ainsi :

1° *S. marcescens* élaborerait une présure dans les milieux contenant des protéines complexes avec des aminoacides et de l'ammoniaque comme source d'azote.

2° La formation de cette présure serait à son maximum d'intensité à 37° C.

3° Cette présure se caractériserait par le fait que son action serait thermolabile.

4° Son action serait plus rapide que celle de la présure de veau.

c) Production de triméthylamine

Depuis longtemps on soupçonnait la présence de triméthylamine dans les cultures de *S. marcescens* faites sur Pomme de terre. On se basait pour le détecter sur l'odorat jusqu'au jour où ACKERMANN et SCHÜTZE (1911),

s'occupant de cette question, la résolurent scientifiquement et établirent les faits suivants :

1° *S. marcescens* produit réellement de la triméthylamine dans ses cultures sur Pomme de terre.

2° La Pomme de terre est le seul milieu où puisse se produire la triméthylamine.

3° La lecythine et la choline doivent être considérées comme les substances mères de la triméthylamine. L'addition d'une de ces substances à la Pomme de terre augmente sensiblement la production de triméthylamine.

d) Production d'indol.

S. marcescens produit de l'indol dans les cultures sur bouillon (FORTINEAU 1904).

e) Production d'hydrogène sulfuré.

S. marcescens ne produit pas d'hydrogène sulfuré dans les milieux ordinaires (FORTINEAU 1904), mais ce dégagement s'effectue sur le milieu de FRAENKEL additionné de cystine (SASAKI et OTSUKA 1912).

f) Fermentation des milieux sucrés.

En 1886, LIBORIUS avait remarqué que les cultures de *S. marcescens*, en gélatine dextrosée, présentaient un dégagement gazeux. D'après SCHOTTELIUS (1887), ce gaz se-

rait de l'acide carbonique résultant de la transformation du sucre en alcool. Au contraire, SCHEURLÉN (1896) et RITTER (1900) attribuent l'apparition de CO_2 à l'action de l'acide succinique, prenant naissance dans ces conditions, sur le carbonate de soude qui avait servi à neutraliser le milieu. En effet, en remplaçant le carbonate de soude par du phosphate de la même base, aucun dégagement n'avait lieu. Ces conclusions ne sont admises par HEFFERAN (1904) qu'en ce qui concerne le lactose et le sucrose.

g) Réduction des nitrates.

Pour HEFFERAN (1904), *S. marcescens* est capable de réduire les nitrates en nitrites et cette réaction pourrait aller jusqu'à la formation d'azote.

Précisant l'action sur les liquides de culture, PEDERSON et BREED (1928), qui cultivaient *S. marcescens* sur le milieu de composition suivante :

Sulfate de magnésie.....	1
Nitrate d'ammoniaque	5
Chlorure de calcium.....	0,1
Glucose	5
Eau distillée q. s. p.	1000

ont pu constater la formation de produits divers : acide formique, succinique, lactique, alcool éthylique, acétylméthylcarbinol, 2-3 butylène-glycol, hydrogène, traces d'acétaldehyde et d'acétone.

B. — *S. KILIENSIS* COMITE S. B. A.
(*Bacterium h BREUNIG*)

La bibliographie se rapportant à ce germe n'est pas très importante. Les renseignements que nous avons pu nous procurer ont été puisés dans les publications de BREUNIG (1888) et de LAURENT (1890).

I. — CARACTERES GENERAUX DE CULTURE.

Température optima et température mortelle.

S. kiliensis croît bien à une température comprise entre 18°C. et 35°C. Un chauffage de cinq minutes à 70°C. suffit pour le tuer (LAURENT).

Dans un vide partiel, *S. kiliensis* forme des cultures achromogènes.

II. — ASPECT DES CULTURES.

L'aspect des cultures de *S. kiliensis* est assez voisin de celui des cultures de *S. marcescens*. A eux seuls les caractères de culture ne permettent pas de différencier ces deux microorganismes à pigment rouge.

a) Milieux solides usuels

Gélatine. — D'après LAURENT, sur plaques de bouillon gélatinisé, le *Bacille rouge* (*S. kiliensis*) donne dans la profondeur des colonies ovales, à contour entier ou sinueux, jaunes pâles au microscope et blanches à l'œil nu. Elles sont entourées d'une zone claire et dès le cinquième jour, liquéfient la gélatine. Après six à sept jours, les colonies les plus voisines de la surface deviennent légèrement roses; plus profondément elles restent incolores par suite de manque d'oxygène libre.

BREUNIG (1890), qui avait fait un ensemencement en piqure, a observé une liquéfaction en entonnoir avec formation de gaz. Après quelques jours il ne restait dans le tube qu'un liquide rouge clair, avec au fond, un dépôt rouge.

Gélose. — Sur gélose on obtient une culture rose qui vire au rouge foncé (teinte cire à cacheter) et présente des reflets métalliques. Cette coloration brunit en vieillissant (FORTINEAU 1904).

Pomme de terre. — *S. kiliensis* forme sur Pomme de terre des granulations qui se fondent entre elles et couvrent toute la surface. La couleur est d'abord rouge brique, puis rouge foncé, avec un voile brillant, mais sans odeur de triméthylamine (BREUNIG 1890).

b) Milieux liquides usuels

Bouillon. — Cultivé sur bouillon, à la température ordinaire, *S. kiliensis* détermine en vingt quatre heures un trouble et une coloration rose du milieu. Au dessus de 35° C., la culture est incolore (FORTINEAU 1904).

Lait. — Ce milieu est coagulé, mais cette coagulation serait due à l'acidité formée (LAURENT 1890).

c) Milieux synthétiques

Différents milieux synthétiques conviennent à la culture de *S. kiliensis*. Le milieu L¹ de LASSEUR permet d'obtenir d'excellents résultats tant au point de vue de la croissance qu'au point de vue de la chromogénèse.

CHAPITRE V

POUVOIR PATHOGÈNE ET RÔLE DANS LES ASSOCIATIONS MICROBIENNES

Etudier le pouvoir pathogène d'un germe est faire œuvre de pathologiste. Nous nous garderons bien d'approfondir cette question. Nous nous contenterons cependant de signaler quelques faits.

Il est bien difficile de ranger un germe dans la catégorie des germes pathogènes ou des germes saprophytes. Le pouvoir pathogène est fonction, en dehors de la virulence et du pouvoir toxigène d'une Bactérie, de l'organisme auquel elle a été inoculée.

On en est réduit à se contenter d'approximations. Cette fonction, en effet, est sous la dépendance de facteurs susceptibles de variation dans des sens parfois très opposés.

M. le Professeur VINGENT (1898) a montré qu'il était possible de faire acquérir à des germes tels que *B. mesentericus vulgatus*, *B. megatherium*, un pouvoir pathogène pour le Cobaye, en cultivant ces Bactéries dans des

sacs de collodion inclus dans la cavité péritonéale de cet animal (Méthode de Roux).

A la suite de son expérimentation, ce grand savant mettait en évidence, d'une façon indéniable, le fait que les germes saprophytes peuvent s'adapter à la vie parasitaire et devenir de véritables agents pathogènes. La propriété ainsi acquise ne serait cependant qu'un attribut contingent et instable, au même titre que certaines autres propriétés des microbes.

Le pouvoir pathogène de *S. kiliensis* n'ayant pas été étudié, nous résumerons dans ce chapitre la littérature relative à *S. marcescens*.

I. — ETUDE DU POUVOIR PATHOGENE

a) Action sur l'Homme et sur les animaux

Pour la majorité des auteurs, *S. marcescens* est un germe saprophyte banal, sans danger pour l'Homme. Toutefois, sa présence ayant été signalée dans certaines suppurations, les résultats des essais d'inoculation aux animaux méritent néanmoins d'être rapportés.

Citons tout d'abord les expériences de GRAWITZ et de DE BARY (1887). Ces savants provoquaient la formation d'abcès chez le Rat, le Lapin et le Chien en leur injectant des cultures de *S. marcescens*. L'action nocive restait locale sans atteindre l'état général.

Deux années plus tard, ROGER (1889), inoculant dans

les veines du Lapin des quantités notables de *S. marcescens*, ne parvenait pas à provoquer la mort de l'animal, mais constatait l'apparition de légers troubles morbides. La maladie contractée dans ces conditions, bien que légère et pouvant passer inaperçue sans une observation attentive, était « *suffisante pour modifier profondément l'état de l'animal et abolir son immunité* ».

Après STEINHAUS (1889), dont les résultats diffèrent peu de ceux de GRAWITZ et de DE BARY, de ROGER, l'étude du pouvoir pathogène de *S. marcescens* fut reprise par BERTARELLI (1903). Les souches utilisées par ce dernier auteur provenaient, l'une d'un isolement fait à partir d'une eau potable de Turin (peu de temps après qu'une grande quantité de ces germes y avaient été jetés afin de vérifier la valeur de la filtration), l'autre de la collection de KRAL.

A la suite de nombreuses expériences, BERTARELLI arrivait à plusieurs conclusions que nous pouvons classer ainsi :

1° L'action pathogène de *S. marcescens* n'est effective que pour un certain nombre d'animaux qui sont par ordre de sensibilité croissante : le Lapin, le Cobaye, le Rat et la Souris.

2° Les passages par l'animal n'augmentent pas l'action pathogène; seul, dans ces conditions, le pouvoir chromogène est accru et la forme en coccus disparaît en partie.

3° Le pouvoir pathogène des vieilles souches est plus élevé que celui des jeunes.

4° Les cultures mortes sont aussi actives que les cultures vivantes.

5° Parmi les différents modes d'inoculation utilisés, la piqure intraveineuse s'est montrée la plus active.

6° Les produits solubles, extraits des corps microbiens, ne sont pas toxiques, mais contiennent une substance hémolytique agissant seulement sur les globules rouges du Cobaye et pas sur ceux du Lapin.

7° Cette toxicité est due aux corps microbiens eux-mêmes.

Quand l'animal inoculé est le Cobaye, on peut constater les symptômes suivants : le péritoine est irrité, les reins sont hyperémiques et la rate contient de nombreux *cocci*. Si la mort ne se produit qu'après trente six heures, on observe macroscopiquement et microscopiquement une dégénérescence graisseuse du foie. On se trouve donc en présence d'une forte intoxication, ce qui, toutefois, n'exclut pas la possibilité d'une septicémie. BERTARELLI a pu se rendre compte que *S. marcescens* s'était multiplié dans le sang et dans les organes d'animaux qui n'avaient pas encore succombé à l'injection de ce germe.

Des expériences semblables à celles que nous venons de citer ont été faites par MARX (1900) sur des animaux à sang froid. Des cultures de *S. marcescens*, injectées dans les muscles de la cuisse de la Grenouille, y déterminaient une inflammation. Après vingt quatre heures l'animal mourait et l'on pouvait isoler, des différents

organes, des cultures pures de *S. marcescens* dont le pouvoir chromogène était amoindri.

b) Action sur les plantes

En 1879, PRILLIEUX signalait une altération des grains de blé, due très probablement à *S. marcescens*. Ce parasite détruisait la plus grande partie du grain, s'attaquant tout d'abord à l'amidon, puis à la matière azotée et à la cellulose.

De l'ensemble des travaux cités, il ressort que le pouvoir pathogène de *S. marcescens* est faible. Voyons maintenant quel rôle ce germe peut jouer dans les associations microbiennes.

II. — ROLE DANS LES ASSOCIATIONS MICROBIENNES

L'action réciproque de plusieurs germes peut être considérée soit *in vivo*, soit *in vitro*. Ces deux cas sont nettement différents et les résultats constatés dans le premier ne sont pas nécessairement vrais dans le second.

a) Association *in vitro*

Associés *in vitro*, c'est-à-dire sur un milieu de culture de laboratoire, deux germes peuvent végéter soit dans

une indifférence mutuelle, soit en se rendant utile l'un pour l'autre, soit au contraire en se gênant.

L'indifférence indique un partage pur et simple des éléments nutritifs.

L'action favorisante peut avoir plusieurs causes. Dans certains cas, le premier germe, par son action chimique, ramène la réaction du milieu à un pH favorable à la croissance du second germe. Dans d'autres cas, un germe aérobic, épuisant l'oxygène libre du milieu, permet la croissance d'un germe anaérobic. On se trouve parfois en présence de la destruction d'éléments nuisibles ou de la formation de produits très assimilables.

On peut de même expliquer l'action empêchante par un changement de pH du milieu, par la formation de substances nuisibles, par l'épuisement des réserves nutritives (germes de vitalités différentes).

Un cas d'action favorisante nous est signalé par Novy (1894). Cet auteur n'arrivait à cultiver une souche particulière de *Vibrio septique* sur gélose, qu'en ensemençant, en même temps, d'autres germes tels que *S. marcescens*, *B. proteus vulgaris*.

Nous avons vu précédemment comment TEMPÉ (1931) est arrivé à établir une technique de culture des microbes anaérobies en se servant de vases de culture dans lesquels l'oxygène était absorbé par *S. marcescens*.

Il ne manque pas d'exemples pour illustrer les différents cas d'association *in vitro* et c'est afin de ne pas sortir du cadre de ce travail, que nous nous limitons à ceux où *S. marcescens* est envisagé.

b) Association *in vivo*

L'association *in vivo*, comme son nom l'indique, se passe dans un organisme vivant.

Grâce aux travaux de ROGER (1889, 1895, 1899), VAILLARD et VINCENT (1891), VAILLARD et ROUGET (1892), BESSON (1895), BERTARELLI (1903), nous connaissons les phénomènes résultant de l'association de *S. marcescens* avec le virus du charbon symptomatique, avec le Vibrion septique et avec les spores du Bacille tétanique.

Association de *S. marcescens*
et du virus du charbon symptomatique

C'est à ROGER (1889, 1895) que nous sommes redevables des travaux relatifs à cette association. Ce savant injectait simultanément au Lapin 0 cm³ 5 d'une culture de *S. marcescens* stérilisée et 0 cm³ 01 d'une culture charbonneuse. Il constatait chez l'animal une lésion locale, caractérisée par de la tuméfaction, de la rougeur et de la chaleur; la maladie du charbon évoluait. Or, l'un ou l'autre des deux germes était incapable de provoquer par lui-même des troubles appréciables. L'association avait donc favorisé l'action de la culture charbonneuse sans qu'il soit possible d'en attribuer la cause, soit à un accroissement du pouvoir pathogène, soit à l'abolition de l'immunité naturelle du Lapin.

Dans une autre expérience, ROGER injectait le charbon dans un muscle et *S. marcescens* dans une veine. La mort survenait après vingt quatre heures avec tumeur charbonneuse. Le résultat était donc plus rapide et plus certain en faisant les piqures à des endroits différents. Si l'injection de *S. marcescens* avait lieu un ou deux jours après celle du charbon, aucune lésion n'apparaissait.

Selon ROGER, *S. marcescens* agit en affaiblissant la résistance de l'animal (1) auquel il communique une aptitude morbide qui n'est d'ailleurs que transitoire (dernière expérience) (2).

Association de *S. marcescens* et des spores tétaniques

Cette association a été étudiée par VAILLARD, VINCENT et ROUGET (1892).

Ces savants établirent que les spores tétaniques débarrassées de leur toxine, soit par la chaleur, soit par des lavages abondants, et rapides, peuvent être inoculées sans danger à un animal réceptif comme le Lapin. Ils constatèrent aussi que le résultat différait s'ils ajoutaient aux

(1) Cette action serait due à la triméthylamine que produit *S. marcescens*.

(2) Ces expériences donnaient les mêmes résultats avec le Pigeon. Au contraire, avec le Cobaye, les témoins mouraient plus rapidement que les animaux injectés avec le mélange des deux germes.

spores une petite quantité d'une culture de *S. marcescens*. En effet, dans ce cas le tétanos évoluait. Les filtrats de cultures de *S. marcescens*, de même que les cultures chauffées n'avaient par contre aucune action.

L'abolition de l'immunité du Lapin vis à vis des spores tétaniques lavées seraient due à ce que les leucocytes de l'animal exercent leur action phagocytaire d'abord sur les plastides bactériennes, laissant aux spores le temps de germer.

Dans la nature les spores tétaniques sont la plupart du temps débarrassées de leur toxine et leur action se limite aux cas où elles se rencontrent avec d'autres germes dans les plaies.

Association de *S. marcescens* et du Vibrion septique

En 1895, BESSON constatait que les spores du Vibrion septique lavées n'avaient aucune action sur le Cobaye et sur le Lapin. Au contraire, ces spores devenaient très pathogènes quand on leur adjoignait une culture de *S. marcescens*.

L'étude de cette association fut reprise par ROGER (1899) qui utilisait: 1° des cultures de *S. marcescens* en gélatine, âgées de dix à douze jours et dont trois centimètres cubes, injectés dans les muscles de la cuisse ou sous la peau du Lapin, ne provoquaient aucun trouble notable.

2° des plastides de Vibrion septique obtenues en pré-

levant la sérosité d'un Cobaye qui venait de succomber à une injection de ce germe.

L'injection de la sérosité seule n'avait aucune action sur le Lapin, mais celui-ci périssait en moins de vingt quatre heures avec les muscles ramollis et une plaie dégageant des gaz à odeur nauséabonde, s'il avait reçu en piqure un mélange de Vibrion septique et de *S. marcescens*. Ce dernier restait au point de l'injection, tandis que le Vibrion septique se répandait dans tout l'organisme dont l'immunité naturelle avait été vaincue à son égard.

Dans ce nouvel exemple d'association, *S. marcescens* agirait en modifiant le terrain à l'aide d'un ferment soluble qu'il serait possible d'extraire à l'aide de la glycérine.

BERTARELLI (1903), qui a repris les expériences de ROGER n'est pas toujours arrivé aux mêmes résultats. Cette discordance doit être, vraisemblablement, attribuée à une variation du pouvoir pathogène de *S. marcescens*.

Le mécanisme des actions résultant de l'association de plusieurs germes dans un organisme vivant semble varier suivant les cas considérés. Là, plus qu'ailleurs peut-être, il faut se mettre en garde contre des généralisations hâtives.

CHAPITRE VI

AGGLUTINATION

Si les caractères morphologiques et culturaux ne permettent pas de différencier nettement deux germes on peut avoir recours à l'agglutination.

Les réactions d'agglutination permettent, en effet, de définir l'anticorps quand on connaît l'antigène ou d'identifier l'antigène quand l'anticorps est défini.

Pendant longtemps on a cru que les germes devaient posséder une certaine toxicité, vis à vis des organismes expérimentés, pour pouvoir jouer leur rôle d'antigène. Depuis les recherches de VINCENT, il est difficile de faire une distinction bien nette entre les Bactéries pathogènes. LASSEUR et ses Collaborateurs (1924-28) ont montré qu'on ne pouvait, à priori, limiter l'étude du pouvoir antigène aux Bactéries pathogènes. En effet, ces auteurs ont mis en évidence le fait que des germes pratiquement dépourvus de virulence ou de pouvoir toxigène peuvent, néanmoins, par des injections parentérales, produire dans

l'organisme la formation d'agglutinines et de sensibilisatrices homologues.

C'est ainsi que, dans un remarquable travail, A. DUPAIX (1933), a montré que *B. caryocyaneus*, qui ne semble pas déterminer de modifications sensibles chez les différents organismes expérimentés, pouvait néanmoins fournir des sérums agglutinants dont la dilution limite d'agglutination est de l'ordre de 1/100000°.

HEFFERAN (1906) expérimentant sur de nombreuses souches de *S. marcescens*, a constaté des variations considérables dans leur agglutinabilité. Les dilutions limites d'agglutination étaient du 1/10000 pour la souche n° 1 et du 1/40 pour la souche n° 2. Sans qu'il nous vienne à l'idée de suspecter ces résultats, nous insisterons cependant sur le fait qu'il faut être très prudent lorsqu'il s'agit de germes chromogènes.

Nous rappellerons que les expériences de LASSEUR, MARCHAL et DUPAIX (1930) ont montré que le pouvoir agglutinogène et l'agglutinabilité de différentes races ou souches de *B. caryocyaneus* étaient susceptibles de présenter des variations.

A. DUPAIX (1933) reprenant l'étude de ces faits, envisage l'hypothèse de Biotypes (1).

(1) LASSEUR et MERCIER (1911) ont introduit, les premiers, la notion de Biotypes en Bactériologie.

LASSEUR et ses Collaborateurs, dont les travaux sur l'agglutination des Bactéries sont très nombreux et connus, ont étudié l'action d'un sérum provenant d'un animal préparé avec des plastides de *S. kiliensis*.

Cette Bactérie s'est montrée bon antigène puisqu'elle a permis l'obtention d'un sérum dont la dilution limite d'agglutination atteignait le $1/25000^{\circ}$ en présence d'un sérum homologue (1).

Dans les premières recherches effectuées sur l'agglutination, on avait posé en principe que le sérum préparé avec un germe, n'agglutinait que ce germe. Cette conception ne devait pas durer bien longtemps car, rapidement, on s'est aperçu que le sérum préparé avec le germe « A » pouvait agglutiner non seulement ce germe, mais encore des Bactéries très voisines « A¹ », « A² », « A³ », etc.

La notion de spécificité aurait beaucoup perdu de sa valeur si l'on n'avait alors fait intervenir la notion de taux limite d'agglutination. Le sérum anti « A » agglutine en effet les germes « A¹ », « A² », « A³ », mais à des taux différents et la plus grande dilution limite d'agglutination est atteinte par le sérum homologue.

Le phénomène de CHARRIN et ROGER devait, de ce fait, fournir une nouvelle voie à la Bactériologie. En décelant les *parentés humorales*, il permettait d'entrevoir la possibilité de rapprocher des espèces paraissant écartées les unes des autres, et de rattacher à une espèce déterminée, des germes particulièrement dégradés sous l'action de facteurs défavorables, alors qu'aucun indice ne permettait de les identifier.

(1) Le germe homologue est celui qui a servi à préparer le sérum ; les autres germes sont considérés comme hétérologues par rapport à ce sérum.

NICOLLE donne une explication plausible du phénomène en admettant que la plastide est constituée par une *mosaïque* d'antigènes et que certains des éléments qui la constituent, peuvent être communs à plusieurs espèces.

Les expériences d'agglutination hétérologues effectuées par LASSEUR avec un sérum anti-kiliensis ont donné les résultats suivants :

Plastides bactériennes en présence	Dilutions limites d'agglutination
<i>S. marcescens</i> souche I (Institut Pasteur) (	1/40
<i>S. marcescens</i> souche II (Lab. Microbiol. Nancy)	0
<i>S. marcescens</i> souche III (Lab. Microbiol. Nancy)	0
<i>S. esseyana</i> (Lab. Microbiol. Nancy)	1/100

Remarque : le temps de contact était de quatre heures à 37° C., puis de trois heures à 25° C.

Cette expérience nous révèle que le sérum anti-*S. kiliensis* contient des coagglutinines (ou agglutinines de

groupe) vis à vis de *S. marcescens* (souche I. P.) et de *S. esseyana*. Nous pourrions conclure à l'existence d'une parenté humorale, d'autant plus grande que la limite d'agglutination hétérologue se rapproche plus de l'agglutination homologue (spécifique). En fait, nous verrons que les caractères morphologiques de *S. kiliensis* rapprochent plus ce germe de *S. esseyana* que de *S. marcescens*.

Pour étudier l'agglutination hétérologue ou coagglutination d'une façon approfondie il est nécessaire d'avoir recours à la saturation des agglutinines ou réaction de CASTELLANI. Cette saturation s'effectue dans la zone des faibles concentrations en agglutinines si l'on veut en dépouiller un sérum d'une façon totale. Pour arriver à ce but on met le sérum agglutinant en présence de corps microbiens. Au bout d'un certain temps on centrifuge puis, au liquide décanté, on ajoute une nouvelle quantité de corps microbiens; on centrifuge à nouveau après un temps de contact assez long. Pour pratiquer la réaction de CASTELLANI, LASSEUR préconise la technique suivante: les sérums sont dilués de façon convenable puis des purées microbiennes, parfaitement homogènes (au sens bactériologique du mot), sont préparées avec des germes lavés. Le sérum et les suspensions bactériennes sont mises en contact dans des vases de verre très résistant. On centrifuge puis on recherche le pouvoir agglutinant du liquide décanté.

Opérant sur un sérum anti-*S. kiliensis* LASSEUR et NOBLAT (1928) ont obtenu les résultats suivants :

SATURATION DU SÉRUM ANTI-S. KILIENSIS

Espèces bacté- riennes ayant servi à saturer	Espèces bacté- riennes à agglutiner	Dilutions limites d'agglutinations
S. kiliensis	S. kiliensis	Inférieure à 1/20°
S. kiliensis	S. marcescens ..	Inférieure à 1/20°
S. kiliensis	S. esseyana	Inférieure à 1/20°
S. marcescens ..	S. kiliensis	Au 1/12000°
S. marcescens ..	S. marcescens ..	N'agglutine pas.
S. marcescens ..	S. esseyana	Au 1/80° - 1/100°
S. esseyana	S. kiliensis	Au 1/8000°
S. esseyana	S. marcescens ..	N'agglutine pas.
S. esseyana	S. esseyana	N'agglutine pas.

S. marcescens ne fixe donc qu'une très faible quantité d'agglutinine-*S. kiliensis*. Ce fait est conforme aux différences morphologiques que présentent les deux Bactéries.

Par contre *S. esseyana* est encore agglutiné, ce qui

rapprocherait ce germe de *S. kiliensis* (LASSEUR et NOBLAT 1928).

L'agglutination permet de différencier nettement les trois germes *S. marcescens*, *S. kiliensis* et *S. esseyana* qui présentent cependant des caractères de culture très voisins.

CHAPITRE VII

POUVOIR CHROMOGÈNE

La faculté de donner un pigment, pour certaines Bactéries, constitue un excellent caractère permettant à tout instant de les reconnaître. LASSEUR a montré que, dans l'identification des espèces bactériennes, le pouvoir chromogène doit être considéré comme un caractère essentiel de la diagnose bactérienne.

La valeur de ce caractère s'est considérablement accrue par l'établissement de la formule de constitution de certains pigments tels que la chlororaphine, la prodigiosine, la pyocyanine (LASSEUR 1911, WREDE et HETTCHE 1929, KÖGL et PÖSTOWSKY 1930).

S. marcescens et *S. kiliensis* donnent naissance à un pigment rouge dont la production est plus intense à l'obscurité qu'à la lumière. Nous verrons dans quelles conditions ce pigment apparait, quelles sont ses propriétés physiques et chimiques, quel rôle il joue dans la vie bactérienne.

A. — Pigment secrété par *S. marcescens*

Le pigment secrété par *S. marcescens* a fait l'objet de nombreux travaux; on l'a nommé prodigiosine. Disons tout de suite que cette prodigiosine est une véritable matière colorante pouvant teindre la laine et la soie. Cependant la teinte ainsi acquise, si elle résiste à la lessive, disparaît rapidement sous l'influence de la lumière.

Conditions nécessaires à l'apparition de la prodigiosine

1) *Facteurs répandant des germes*

Le pouvoir chromogène varie avec les souches étudiées. Certaines souches peuvent même devenir achromogènes, à la suite de traitements appropriés.

2) *Facteurs dépendant des milieux de culture*

La composition du milieu de culture exerce une influence importante sur la chromogénèse de *S. marcescens*. Il va sans dire que cette influence ne peut être étudiée avec précision que sur des milieux de composition bien connue. DELANOE (1903) cependant, note que, sur agar, le saccharose, le glucose et surtout le lactose nuisent à la formation du pigment.

Pour SULLIVAN (1903), un milieu synthétique favorable à la chromogénèse de *S. marcescens* doit contenir des corps composés de carbone, hydrogène, azote, des phosphates et des sulfates, sans parler des bases; par contre les sulfures, les bromures, les iodures, les tartrates et les formiates seraient nuisibles.

SAMKOW (1903) précise la nécessité de la présence du magnésium.

D'après HEFFERAN (1904), le sulfate de magnésium ne serait pas nécessaire à la fonction chromogène de toutes les souches de *S. marcescens*.

Cette dernière conclusion est contestée par KUNTZE (1907). Ce savant insiste sur la nécessité d'employer des produits très purs. Il signale que le chlorure de sodium contient souvent des quantités de magnésium et de soufre suffisantes pour modifier la marche d'une expérience. Des recherches de KUNTZE, il résulte que Mg et $\text{SO}^4 =$ sont indispensables à la manifestation de la fonction chromogène de *S. marcescens*.

L'influence du fer sur la production des pigments microbiens a été découverte à Nancy par notre Maître, M. le Professeur LASSEUR. LASSEUR et ses Collaborateurs ont consacré de nombreux mémoires (de 1911 à 1933) à cette recherche. De l'ensemble de ces travaux, il découle que *S. marcescens* ne peut élaborer son pigment qu'en présence de traces de fer.

Pour AMAKO (1930), l'azote de carbone, le magnésium et les sels de l'acide phosphorique sont indispensables à la formation de la prodigiosine.

Aux influences que nous venons de citer il convient d'ajouter celle du pH du milieu HEFFERAN (1904) a remarqué que le pigment avait une tendance à devenir rouge violet dans les milieux acides et rouge orangé dans les milieux alcalins. PÉJU et RAJAT (1907), qui effectuaient des cultures sur des géloses et sur des bouillons de concentrations croissantes en ions OH^- , ont noté que le pigment virait du rouge (milieux acides) au blanc (milieux alcalins), en passant par toutes les teintes intermédiaires. Opérant sur gélose BÉGUET (1928), obtenait les résultats suivants : de pH = 5 à pH = 6 cultures rouge écarlate avec reflets métalliques, de pH = 6 à pH = 7 rouge carmin, à pH = 11 rose faible.

LASSEUR, DOMBRAY et DUPAIX (1931), dans un mémoire sur lequel nous reviendrons, signalent qu'en milieu synthétique de LASSEUR, la concentration en ions H^+ la plus favorable à la production du pigment de *S. marcescens* est comprise entre pH = 5 et pH = 5,6.

3) Action de l'oxygène

L'atmosphère ambiante n'est pas indifférente à la production du pigment. SCHOTTELIUS (1887) avait déjà remarqué que seules les colonies de surface étaient colorées.

Si l'on considère les cultures en milieu liquide effectuées en tubes, on constate que le pigment se forme d'abord à la surface. La pigmentation est plus intense quand les tubes sont inclinés car, de cette façon, la

surface en contact avec l'oxygène de l'air ambiant est plus grande (DELANOE, PEJU et RAJAT 1908).

Les cultures faites sous une couche de paraffine sont achromogènes.

A cela nous pouvons ajouter que le voisinage de liquides à haute tension de vapeur est défavorable à la chromogénèse de *S. marcescens* (CORDIER, PEJU et RAJAT 1908).

4) Action de la température

D'une façon générale la production de pigment se manifeste seulement aux températures inférieures à 34° C.

5) Action de la lumière

La prodigiosine apparaît mieux à l'obscurité qu'à la lumière.

Extraction de la prodigiosine

De nombreuses tentatives ont été faites pour isoler le pigment de *S. marcescens*. LASSEUR et GIRARDET (1926) et plus récemment WREDE et HETTICHE (1930) ont obtenu d'excellents résultats au cours de leurs recherches.

LASSEUR et GIRARDET traitaient des cultures par l'alcool à 95°. En opérant dans le vide la solution obtenue était alors filtrée, évaporée puis reprise par l'alcool absolu.

Après nouvelle filtration et évaporation, le résidu était repris par de l'éther anhydre et la solution éthérée était lavée à l'eau distillée. Après décantation et évaporation, ces savants obtenaient une masse brun rougeâtre offrant des reflets métalliques. Ils la purifiaient ensuite par l'analyse capillaire. Les eaux de lavage de la solution éthérée solubilisaient un pigment jaune, nettement différent de celui resté dans l'éther et qui pouvait être considéré comme un produit d'oxydation.

WREDE et HETTICHE opéraient de façon différente. Leurs cultures étaient effectuées sur gélose peptone additionnée de glucose et de sulfate de magnésie. Après quatre ou cinq jours de suite à l'étuve à 25° C. la masse bactérienne récoltée était mise en contact avec de la lessive de soude. Ceci dans le but de libérer la prodigiosine incluse dans les corps microbiens. Ensuite ils épuisaient les germes, dans une ampoule à décanter, avec un mélange d'éther de pétrole et d'alcool renouvelé plusieurs fois. Les solutions éthérées réunies étaient évaporées jusqu'à volume réduit. Le résidu, lavé à l'eau et soumis à un courant de gaz chlorhydrique, laissait précipiter un chlorhydrate impur. Le produit obtenu était redissous dans l'alcool et traité par l'acide perchlorique qui déterminait la formation de beaux cristaux de perchlorate de prodigiosine. WREDE et HETTICHE obtenaient la prodigiosine en traitant à chaud le perchlorate par de l'alcool et de la soude. La prodigiosine se présentait alors sous la forme d'une masse solide, cassante, avec des reflets métalliques.

Les deux méthodes indiquées permettent d'obtenir le même produit, la prodigiosine.

Caractères de la prodigiosine

1) *Caractères physiques*

La prodigiosine est soluble dans l'alcool, l'éther, le chloroforme, la benzine.

Sous l'influence des bases telles que l'ammoniaque ou la soude, les solutions rouges virent au jaune.

L'alcool absolu donne des solutions jaunes que l'addition d'eau fait virer au rouge carmin (LASSEUR).

SCHRÖTTER (1870), KRUENBERGER (1896), EISENBERG (1891), GRIFFITHS (1892), SCHREIDER (1895), SCHEURLÉN (1896), ROSENBERG (1899), KRAFT (1902) ont étudié le spectre d'absorption de la prodigiosine, mais leurs résultats sont donnés suivant des échelles arbitraires. Cette étude a été reprise par LASSEUR et GIRARDET (1922) qui ont utilisé la notation en longueurs d'onde. Nous rassemblons, ci-dessous une partie de leurs résultats :

Partie visible du spectre

Examen d'une solution à 170 mmgr. pour 10 cm³ d'alcool, sous une épaisseur de 15 mm.

Absorption sélective de ..	$\lambda = 566$ à $\lambda = 488,5$
Assombrissement du spectre de	$\lambda = 488,5$ à $\lambda = 479$
Absorption continue fin du spectre à	$\lambda = 420$

Maximum de Formanek Grandmougin (déterminé par Lasseur).

- 1° Bande $\lambda = 537,5$ bande noire très forte
- 2° Bande $\lambda = 488$ bande noire très faible
- 3° Bande $\lambda = 457$ bande noire très faible

La troisième bande a été signalée aux autres auteurs par G. Gross de Mulhouse.

Si l'on ajoute une quantité suffisante d'ammoniaque à la solution de prodigiosine, seule la troisième bande persiste. Enfin, si la quantité d'ammoniaque n'est pas trop grande, une addition ultérieure d'eau fait disparaître les bandes d'absorption (hydrolyse).

Ultra-Violet

Examen d'une solution à 0,250 mmgr. de prodigiosine par litre d'alcool sous une épaisseur de 40 mm.

- 1° Bande de $\lambda = 288$ à $\lambda = 277$
- 2° Bande de $\lambda = 270$ à $\lambda = 261$
- Fin du spectre du fer à $\lambda = 245$

Maximum de Formanek Grandmougin (déterminé par Lasseur).

- 1° Bande de $\lambda = 280$
- 2° Bande de $\lambda = 266$

Le spectre d'absorption de la prodigiosine est donc parfaitement défini.

Récemment GORBACH (1930) a apporté une confirmation des résultats de LASSEUR en expérimentant sur une prodigiosine extraite suivant la méthode de WREDE et HETTCHÉ.

2) Caractères chimiques

La formule définitive de la prodigiosine n'a été établie qu'en 1930 par WREDE et HETTCHÉ. Nous rappellerons cependant les formules qui lui avaient été attribuées antérieurement :

Date	Auteurs	C %	H %	O %	N %
1892 ..	Griffiths	70,52	9,24	13,20	3,07
1896 ..	Scheurlen	71,58	11,84	16,58	0
		72,64	11,86	13,50	0
1902 ..	Kraft	75,23	7,93	11,82	0,90

Les différences qui apparaissent entre ces divers résultats sont certainement imputables à ce que leurs auteurs n'avaient pas encore isolé un produit pur.

WREDE et HETTCHÉ donnent $C_{20}H_{25}N_{30}$ comme formule chimique de la prodigiosine dont le poids moléculaire serait 323,2. Ces auteurs ont obtenu à l'état cristallisé le perchlorate, le picrate, le salicylate et le benzoate de prodigiosine.

Formation de la prodigiosine

SCHEURLÉN (1896), avec bien des chercheurs, admet que la prodigiosine dérive, par oxydation ménagée, d'une substance blanche, la *leuco-prodigiosine*, qui se formerait chaque fois que *S. marcescens* croît sans donner de pigment.

Localisation de la prodigiosine

SCHOTTELIUS (1887) et MACÉ (1913) pensent que la prodigiosine imprègne tout le protoplasme de la plastide bactérienne, la matière colorante étant capable de diffuser et de former des granulations tantôt plus petites, tantôt plus grandes que le corps bactérien.

Au contraire, pour BEJERINCK (1892) et MOYCHO (1930), le corps bactérien lui-même est toujours incolore.

LASSEUR, VERNIER et DUPAIX (1931), reprenant l'étude de la localisation de la prodigiosine, ont pu démontrer que :

1° A un grossissement d'environ 900 diamètres, la majorité des plastides de *S. marcescens* (prélevées sur une culture très pigmentée) paraissent incolores.

2° En soumettant ces plastides à quatre ou cinq lavages (par centrifugation puissante) le culot de germe reste rouge tandis que les eaux de lavage sont d'un rose faible qui va en décroissant.

3° A un grossissement puissant, on peut apercevoir dans la majorité des plastides des grains rouge rubis ou rouge sombre de taille et de nombre variables. Ces grains s'aperçoivent dans les plastides vivantes comme dans les plastides mortes.

Rôle de la prodigiosine

Il est assez difficile d'attribuer un rôle à la prodigiosine. Pour BOHN (1901) la fonction chromogène n'est pas nécessaire chez les Bactéries.

B. — Pigment sécrété par *S. kiliensis*

Le pigment sécrété par *S. kiliensis* est rouge comme la prodigiosine. Il ne se forme que dans certaines conditions.

Conditions nécessaires à l'apparition du pigment de *S. kiliensis*

1) *Facteurs dépendant des germes*

Comme nous l'avons vu pour *S. marcescens*, *S. kiliensis* donne son pigment avec une intensité variable suivant les souches.

2) Facteurs dépendant du milieu

POUR LAURENT (1890) la chromogénèse de *S. kiliensis* ne peut se manifester dans les milieux légèrement acides. Pour obtenir un maximum de pigmentation on a intérêt à se servir de *substrata* neutres ou légèrement alcalinisés.

3) Action de l'oxygène

LAURENT (1890) a remarqué que sur bouillon gélatiné, seules les colonies de surface, par conséquent en contact avec l'oxygène de l'air, sont pigmentées.

4) Action de la température

Au dessus de 36° C., *S. kiliensis* ne donne plus son pigment (LAURENT).

5) Action de la lumière

S. kiliensis est particulièrement sensible à l'action de la lumière.

Par des isolements plus ou moins prolongés de cultures de *S. kiliensis*, LAURENT est arrivé à obtenir une race achromogène. La partie la plus réfrangible du spectre solaire est celle qui agit le plus dans cette expérience, et son action est plus grande en l'absence d'air.

b) Extraction du pigment

LASSEUR et GIRARDET (1922), ont extrait le pigment de *S. kiliensis* de la même manière qu'ils avaient extrait la prodigiosine. Nous avons donné précédemment leur méthode.

c) Caractères du pigment

LAURENT avait déjà remarqué que les caractères physiques et chimiques du pigment de *S. kiliensis* étaient les mêmes que ceux de la prodigiosine quand LASSEUR et GIRARDET ont signalé, à la suite de longues et minutieuses recherches, que dans la région visible du spectre comme dans l'ultraviolet, le spectre des deux pigments était rigoureusement identique. Il semble donc qu'il ne soit pas trop osé d'assimiler le pigment de *S. kiliensis* à la prodigiosine.

Le fait de rencontrer des germes différents et produisant des substances identiques n'est d'ailleurs pas très rare en Microbiologie (Bactéries fluorescentes).

CHAPITRE VIII

MODIFICATIONS OBSERVÉES CHEZ S. MARCESCENS ET S. KILIENSIS

CUVIER définissait ainsi l'espèce : « *La collection des individus nés les uns des autres, ou issus de parents communs, et de tous ceux qui leur ressemblent autant qu'ils se ressemblent entre eux* ». Il admettait donc deux critères de l'espèce, parenté et ressemblance et croyait à la fixité des espèces.

Depuis, de nombreuses recherches ont contribué à modifier cette conception. Actuellement on admet que l'espèce est susceptible de modifications. Le critère de ressemblance perd donc sa valeur.

La modification peut être passagère ou héréditaire. Dans ce dernier cas, généralement on ne peut la constater qu'après de nombreuses générations. En ce qui concerne les animaux supérieurs on ne possède souvent que les données de l'Anatomie comparée, de la Paléontologie, de l'Embryogénie, pour affirmer les changements survenus dans les caractères d'une espèce.

Il semblait donc intéressant de trouver des êtres vivants dont un seul observateur puisse examiner un très grand nombre de générations.

Les Bactéries, dont la durée d'une génération n'atteint souvent pas une heure, offrent cet avantage. Pour cette raison, de nombreux expérimentateurs ont utilisé les Bactéries comme matériel pour l'étude de la modification des espèces.

Cependant si l'étude de la variabilité chez les Bactéries apparaît séduisante, elle présente des difficultés et des causes d'erreur que nous signalent LASSEUR, MARCHAL et DUPAIX (1930) dans une étude remarquable sur les « Modifications temporaires, modifications durables observées chez les Bactéries » (1). Tout d'abord « *le caractère que nous attribuons à une souche microbienne est le caractère moyen d'une population* » ; une modification, même héréditaire, survenue sur une seule plastide, peut parfaitement passer inaperçue. D'autre part, il faut absolument observer des cultures issues d'une plastide unique (cultures pures) et toute contamination doit être écartée.

Parmi les caractères microbiens, la chromogénèse est un de ceux dont on peut le plus facilement observer les modifications.

SCHOTTELIUS (1877) obtenait des cultures achromogènes de *S. marcescens* en sélectionnant les parties les moins colorées de vieilles cultures sur gélatine.

(1) Trav. du Lab. de Microbiol. de Nancy, Fasc. III, p. 105-158.

WASSERZUG (1888) et DELAÑOE (1906) soumettaient leurs germes à des températures de 37-39° C., pour arriver au même but.

SCHEURLÉN (1896) faisait agir de l'hydrogène naissant tandis que CORDIER, RAJAT et PÉJU (1908) cultivaient *S. marcescens* en atmosphère saturée par des liquides à haute tension de vapeur.

BELJERINCK (1912) a décrit quatorze modifications de *S. marcescens* en se fondant souvent sur des différences de viscosité et de pigmentation. Ph. EISENBERG (1914) a signalé vingt deux variétés du même germe.

Tout en conservant l'admiration que l'on a pour des sàvants tels que BELJERINCK et EISENBERG, il convient de faire des réserves sur ce nombre de modifications. LASSEUR, MARCHAL et DUPAIX (1930) n'ont-ils pas écrit à la suite de recherches minutieuses: « *suivant les milieux de culture, beaucoup de formes bactériennes donnent des colonies plus ou moins visqueuses et nous avons obtenu des cultures très visqueuses de B. prodigiosus qui spontanément faisaient retour au type normal (et celà au bout d'un ou deux passages). Nous ferons la même observation en ce qui concerne les types roseus et auratus de BELJERINCK. Puisqu'une même culture, suivant son âge, offre un aspect rosé ou légèrement orangé, nous ne voyons pas la nécessité de créer des races fondées sur de tels caractères et celà d'autant moins que ces modifications ne sont pas durables. Si le milieu est légèrement alcalin, le pigment rouge vire à l'orangé et, si le milieu est légèrement acide, le pigment orangé vire au rouge* ».

Nous dirons maintenant quelques mots de la modification blanche de *S. marcescens* étudiée par LASSEUR, MARCHAL et DUPAIX (1930). Un an après son réensemencement, une culture qui avait séjourné pendant douze ans dans des tubes scellés, présenta spontanément, dans les isolements sur gélose, des colonies blanches et des colonies rouges. Durant trois ans, les colonies blanches, malgré de fréquents passages sur Pomme de terre glycélinée, entre chaque isolement, donnèrent des colonies blanches ou blanc-jaunâtre, mais jamais rouges. Une race blanche avait donc pris naissance sans contestations possibles, car des précautions scrupuleuses avaient été prises pour éviter toute contamination.

Cette race blanche a été étudiée par LASSEUR, MARCHAL et DUPAIX (1930), avec d'autant plus de précision que ces chercheurs isolèrent des plastides uniques de chaque variété (1). En plus de la perte de son pouvoir chromogène, la nouvelle race présente une diminution en général de tous ces caractères sauf de ses caractères sérologiques. Le sérum préparé avec une souche rouge (issue d'une plastide unique) agglutinait à une même dilution cette race rouge et la race blanche (issue d'une plastide unique).

En dehors de la formation de cette race blanche, LASSEUR, examinant des colonies de *S. marcescens* sur

(1) Le mode opératoire utilisé pour isoler les plastides uniques est indiqué p. 125 des « Travaux du Laboratoire de Microbiologie » 1930 et dans le travail de M. G. MARCHAL « Variation et mutation chez les Bactéries ».

plaques de gélose, avait remarqué que certaines étaient rondes tandis que d'autres étaient pourvues de prolongements nombreux. *A priori* on pouvait supposer l'existence de deux variétés. Cependant LASSEUR, MARCHAL et DUPAIX ont démontré qu'il n'en était rien.

Examinées à un fort grossissement les colonies rondes apparurent constituées par des germes immobiles tandis que les colonies étoilées contenaient une majorité de germes mobiles.

Après avoir mis en évidence que la motilité des germes à la surface de la gélose est fonction, dans une certaine mesure, de la quantité d'eau libre à la surface de la gelée les auteurs firent varier l'épaisseur de cette couche liquide. A cet effet des géloses de concentrations différentes furent préparées puisensemencées. La gélose à 3 % ne donna que des colonies rondes tandis qu'à la concentration de 1,5 % elle n'offrit que des colonies étoilées. De plus en faisant varier la tension de vapeur à l'intérieur des boîtes de PÉTRI, il fut possible d'obtenir à volonté des colonies rondes ou des colonies étoilées.

Nous ne pouvons moins faire que de citer les conclusions de ces belles recherches : « *La production des colonies rondes ou étoilées, plissées ou lisses, est sous la dépendance de facteurs simples, c'est une façon d'être du germe à des conditions déterminées et en aucune façon il ne saurait être question de variation, de dissociation ou de mutation* ».

DEUXIÈME PARTIE

ETUDE EXPÉRIMENTALE ET COMPARATIVE

DE

Serratia marcescens. BIZIO, 1823
(*Bacillus prodigiosus*, FLÜGGE) ;

Serratia kiliensis, COMITE S. B. A., 1923
(*Bacterium h.* BREUNIG) ;

Serratia essayana n. sp. COMBE. 1933
(*Bacille rouge d'Essey*, LASSEUR).

CHAPITRE I

MORPHOLOGIE

De nombreuses espèces microbiennes, cultivées dans les meilleures conditions de développement, présentent un polymorphisme qui pourrait faire douter de la pureté des souches examinées.

La forme bactérienne est influencée par de nombreux facteurs tels que la température, la composition et la réaction des milieux nutritifs, l'âge des cultures, le passage par l'organisme animal, etc.

Cependant, dans bien des cas, si l'on fait cesser l'action du facteur qui détermine la modification, une culture bactérienne reprend, au bout d'un temps plus ou moins long, son aspect primitif.

Il semble donc que, bien qu'elle ne soit plus guère en faveur, la morphologie puisse rendre d'utiles services dans la diagnose des espèces, à condition, toutefois, de préciser les conditions d'expérience.

En effet, si l'on examine un nombre suffisant (1) de plastides d'une espèce cultivée sur un milieu et dans des conditions normales, on s'aperçoit que les différentes tailles sont en proportions fixes. A chaque espèce correspond une courbe des fréquences des tailles, des maxima et des minima de longueur. Ici intervient la loi des grands nombres et les résultats n'ont de valeur que si la quantité des éléments examinés est assez élevée.

A. — Forme

Les germes que nous avons examinés provenaient de cultures, effectuées sur gélose peptone de $\text{pH} = 7$, et âgées de 48 h.

Les suspensions des plastides, obtenues par simple agitation des cultures avec de l'eau distillée, étaient étalées sur des lames bien propres. Après séchage à une douce température, les préparations étaient colorées suivant la méthode panoptique de PAPPENHEIM.

S. marcescens

Cette espèce se présente sous une forme ovulaire ou arrondie; son protoplasme, très vacuolaire, rappelle un

(1) Epreuve à laquelle faisait allusion M. le Professeur DARMOIS dans sa conférence sur l'« Etude numérique des faits collectifs, lois statistiques » faite au Laboratoire de M. le Professeur LASSEUR.

réseau dont les mailles contiennent des points chromatiques aux deux pôles ainsi qu'une vacuole centrale. Les germes sont généralement isolés, plus rarement groupés par deux; dans ce cas, les deux formes ovales sont reliées par un petit pont de protoplasme (plasmodème). Quelques formes sont plus allongées et légèrement courbées.

S. kiliensis

Ce germe est un Bacille de forme droite aux extrémités arrondies. La taille est assez homogène bien que l'on puisse distinguer un type long et un type court. Le protoplasme est nettement vacuolaire et les vacuoles sont tantôt pariétales, tantôt centrales. Celles-ci nombreuses et petites dans les formes longues, sont distribuées suivant le grand axe. Quelquefois on note la présence de vacuoles terminales.

S. esseyana

La culture de ce germe est constituée par des formes bacillaires droites à extrémités arrondies, parfois légèrement incurvées. En général le protoplasme paraît homogène; dans quelques cas cependant on aperçoit de petites vacuoles. Il peut arriver que plusieurs plastides réunies par leurs extrémités, donnent l'impression d'un long filament. La taille de ce germe est moins homogène que celle de *S. kiliensis*,

La comparaison des trois espèces permet de mettre en évidence le fait principal suivant :

Souches	Forme générale
<i>S. marcescens</i>	Ovalaire
<i>S. kiliensis</i>	Bacillaire
<i>S. esseyana</i>	Bacillaire

Cette différenciation serait impossible si l'on s'adressait à des cultures plus âgées. Dans ce cas, en effet, *S. marcescens* se présente sous une forme plus allongée.

B. — Dimensions

Utilisant les mesures effectuées avec toutes les garanties possibles par notre camarade ROLIN (1929), nous avons établi les tableaux qui suivent. Après, des temps définis sont indiqués : la fréquence maxima observée sur cent germes examinés (éprouvette), les dimensions de L et de l et le rapport L/e correspondant, le maximum et le minimum observés parmi les tailles.

Le rapport de L/e (de LASSEUR), où L représente la longueur de la plastide et l sa plus grande largeur, permet de donner à la forme une définition plus mathématique. Grâce à la connaissance des variations de ce rapport, il est possible de suivre l'allongement ou le raccourcissement de la plastide.

DIMENSIONS

Cultures sur Pomme de terre effectuées à la température du laboratoire. Préparations colorées à la fuchsine formolée et examinées entre lame et lamelle.

Germes	Age de la culture	Fréquence maxima observée	Dimensions exprimées en μ correspondantes	Rapport L/l correspondant	Variations de L et de L/l
<i>S. marcescens</i> .	2 j.	9 %	L = 1,5 l = 0,8	1,8	$1 \mu \ 3 < L < 2 \mu \ 3$ $1,3 < L/l < 3,2$
	4 j.	8 %	L = 1,4 l = 0,8	1,7	$1 \mu \ 1 < L < 2 \mu \ 6$ $1,2 < L/l < 2,8$
	10 j.	20 %	L = 1,2 l = 0,7	1,7	$0 \mu \ 8 < L < 1 \mu \ 9$ $1,3 < L/l < 2,7$
	20 j.	15 %	L = 1,2 l = 0,6	2	$0 \mu \ 7 < L < 1 \mu \ 7$ $1,3 < L/l < 2,4$
	30 j.	10 %	L = 1 l = 0,6	1,6	$0 \mu \ 5 < L < 1 \mu \ 8$ $1 < L/l < 3,2$
<i>S. kiliensis</i>	24 h.	8 %	L = 1,9 l = 0,6	3,1	$1 \mu \ 5 < L < 4 \mu$ $2,5 < L/l < 6,6$
	3 j.	6 %	L = 2 l = 0,8	2,5	$1 \mu \ 5 < L < 3 \mu \ 8$ $2 < L/l < 4,2$

Germes	Age de la culture	Fréquence maxima observée	Dimensions correspondantes exprimées en μ	Rapport L/l correspondant	Variations de L et de L/l
<i>S. kiliensis</i> (suite)	7 j.	7 %	L = 2,2 l = 0,8	2,7	$1 \mu^4 < L < 3 \mu^4$ $1,5 < L/l < 4,1$
	10 j.	9 %	L = 2 l = 0,7	2,8	$1 \mu^4 < L < 4 \mu^3$ $2 < L/l < 5,5$
	21 j.	13 %	L = 1,7 l = 0,7	2,4	$1 \mu^2 < L < 2 \mu^8$ $1,6 < L/l < 4,1$
<i>S. esseyana</i>	2 j.	5 %	L = 2,9 l = 0,7	4,1	$1 \mu^5 < L < 6 \mu^8$ $2,1 < L/l < 8,5$
	4 j.	8 %	L = 1,9 l = 0,6	3,1	$1 \mu^4 < L < 3 \mu^1$ $2,3 < L/l < 5,1$
	10 j.	9 %	L = 2,2 l = 0,6	3,6	$1 \mu^4 < L < 4 \mu^2$ $2,8 < L/l < 7$
	20 j.	8 %	L = 2,1 l = 0,6	3,5	$1 \mu^4 < L < 3 \mu^8$ $2,4 < L/l < 1,6$
	30 j.	7 %	L = 1,5 l = 0,6	2,5	$0 \mu^9 < L < 2 \mu^4$ $1,2 < L/l < 3,4$

C. — Coloration naturelle des plastides

Examinés entre lame et lamelle, à un grossissement moyen, les trois germes paraissent incolores s'ils sont isolés. Au contraire, lorsqu'ils sont groupés, les petits amas formés sont légèrement roses.

Un examen à un très fort grossissement a néanmoins permis d'apercevoir dans les plastides de *S. marcescens*, des grains rouge-rubis ou rouge sombre, de taille et en nombre variables, disposés de différentes manières (1).

D. — Coloration de Gram

Pendant un certain temps, on se contenta des résultats qualitatifs donnés par la méthode de Gram, mais bientôt, à la suite de discussions au sujet de germes tels que le Gonocoque, tantôt classé « *Gram positif* », tantôt « *Gram négatif* », on songea à donner plus de précision à cette méthode. Avec HJLMANS VAN DER BERG (1896), NEIDE (1904), A. MEYER et ses Collaborateurs (1912), LASSEUR et SCHMIDT (1927), COUDRAY (1929), on est arrivé à ne plus considérer que la notion de vitesse de décoloration. « *Tous les germes sont décolorés par l'alcool ; seuls les temps de décoloration varient* » (LASSEUR). Nous avons donc recherché les

(1) LASSEUR, VERNIER, DUPAIX et COMBE. Trav. du Lab. de Microbiol. Nancy 1931, p. 73-83.

vitesse de décoloration des trois germes étudiés ici, dans la méthode de Gram.

Technique employée. — Des cultures sont effectuées sur gélose peptone de $\text{pH}=7$, en boîtes de Pétri, à la température du laboratoire. Quand à la culture à l'âge désiré, on en fait une suspension en imprimant des mouvements lents à la boîte dans laquelle on a mis un à deux centimètres cubes d'eau distillée stérile. L'émulsion est ensuite étalée sur des lames non grasses de façon à ce que les germes soient suffisamment séparés les uns des autres.

Nous avons opéré par séries de six lames pour chaque germe et pour chaque temps de décoloration. Voici l'ordre et les temps de passage dans les différents bains :

1° Violet de gentiane.....	2'
2° Lugol a).....	0'15"
« b).....	1'45"
3° Alcool à 95°.....	3", 5", 7", 9", 11"
4° Eau de lavage (distillée).....	2'

Pour mieux distinguer les temps *minima* de décoloration nous n'avons pas fait de coloration de contraste.

Tous les germes d'une préparation ne se décolorant pas à la même vitesse, nous donnons les temps après lesquels il ne restait plus aucune plastide colorée.

RESULTATS

Souches	Temps <i>minima</i> de décoloration	
	Culture âgée de 24 h.	Culture âgée de 10 jours
<i>S. marcescens</i>	9"	11"
<i>S. kiliensis</i> ..	9"	9"
<i>S. esseyana</i>	7"	9"

Une préparation témoin de Staphylocoque doré (1), traitée de la même manière, n'était pas décolorée après vingt minutes.

Il suffit donc d'un temps d'action de l'alcool très court (quelques secondes) pour décolorer les trois germes. Pour *S. marcescens* et *S. esseyana*, ce temps de décoloration augmente avec l'âge.

Ce fait trouve son explication dans ces mots de LASSEUR et SCHMIDT (1927): « *Il y a pour chaque espèce bactérienne un stade où la vitesse de décoloration atteint son maximum. C'est en général au moment où le cytoplasme n'offre aucune différenciation et paraît homogène ainsi que celà s'observe pour les plastides jeunes. Mais, comme chaque espèce parcourt son cycle avec une vitesse déter-*

(1) Test de LASSEUR.

minée (pour des conditions données) il en résulte que le stade de durée maximum correspond à des cultures dont l'âge varie avec l'espèce expérimentée ».

E. — Motilité

En dehors du mouvement brownien, commun à toutes les particules solides en suspension dans un liquide peu visqueux, certaines Bactéries, possédant des cils (ou fouets), sont capables de se déplacer activement.

Leur mouvement, s'effectuant différemment suivant les espèces, est influencé, comme toutes les manifestations vitales, par des causes diverses. La composition du milieu nutritif, la viscosité du milieu dispersif, la température, l'oxygène sont autant de facteurs qui entrent en jeu.

Ici encore il est nécessaire de préciser les conditions d'expérience. Si l'on opère sur des suspensions entre lame et lamelle on devra tenir compte de plusieurs causes d'erreur. La couche liquide examinée devra être suffisante pour que les forces capillaires ne gênent pas les déplacements; la mise au point se fera à égale distance des deux faces de verre limitant la suspension, et la platine du microscope sera fixée horizontalement (afin d'éviter des déplacements du liquide).

Nos examens ont été faits entre lame et lamelle, sur des cultures effectuées en eau peptonée de $\text{pH} = 7$ à la température du laboratoire.

Résultats. — *S. marcescens.* — Les plastides d'une culture de 48 h. présentent des mouvements de rotation rapides donnant l'impression de tourbillons qui se déplacent suivant des lignes plus ou moins brisées, affectant parfois des mouvements de balancier.

S. kiliensis. — Dans les mêmes conditions ce germe présente une motilité faible; la majorité des plastides ne fait qu'osciller autour du grand axe, avec de légers mouvements de translation.

S. esseyana. — Ce germe offre au contraire des mouvements très rapides de rotation et de translation. Les germes les plus longs progressent en serpentant.

S. marcescens et *S. esseyana* se meuvent donc rapidement tandis que, dans les mêmes conditions, *S. kiliensis* n'offre que des mouvements insignifiants.

F. — Fouets

La mise en évidence des fouets des Bactéries est très délicate et demande une grande expérience. M. le Professeur LASSEUR a bien voulu mettre à notre disposition une série de préparations de fouets, colorés par l'imprégnation à l'argent (1).

(1) LASSEUR, VERNIER, DUPAIX et ZAHL Trav. du Lab. de Microbiol. Nancy fasc. III.

Nous avons ainsi pu constater que les fouets de *S. marcescens*, *S. kiliensis* et de *S. esseyana* sont diffus.

Chez *S. esseyana* le nombre des fouets varie de 2 à 6. Cela tient en partie à la fragilité d'insertion des organes moteurs. Ces derniers se détachent très facilement de la plastide ainsi qu'en témoigne le nombre de fouets libres dans les préparations. La méthode utilisée pour la mise en évidence des fouets ne saurait être rendue responsable de cet état de choses. En effet, avec les autres Bactéries étudiées par LASSEUR, les préparations sont extrêmement pauvres en fouets libres.

CHAPITRE II

CARACTÈRES DE CULTURE

Ensemencée sur un milieu nutritif et dans des conditions favorables, une plastide bactérienne s'y multiplie après une phase latente qui varie avec l'espèce et le milieu. Elle emprunte les éléments qui sont nécessaires à sa nutrition et abandonne des produits de déchet. De l'ensemble de ces phénomènes résulte l'aspect des cultures.

Chaque espèce ayant ses exigences particulières et se développant avec une vitesse spéciale, on comprend l'importance des caractères de culture dans la description d'une espèce.

A. — Caractères généraux de culture

a) *Aérobiose*

Pour savoir quel est le rôle de l'oxygène de l'air dans le développement des cultures de *S. marcescens*, *S. ki-*

liensis et *S. esseyana* nous avons effectué les expériences suivantes :

Des tubes contenant de l'eau peptonée à 2 %, de pH = 7, sur une hauteur de trois centimètres, sontensemencés avec les trois germes. On fait alors aussitôt le vide dans ces tubes à l'aide d'une trompe à eau et l'on provoque une ébullition prolongée du liquide en le portant à la température de 37° C. Les tubes sont enfin scellés et mis à l'obscurité à la température du laboratoire.

Dans ces conditions nous avons observé que les trois germes forment un léger trouble du milieu après quarante-huit heures. Ce trouble, dû sans doute à une élimination imparfaite de l'air, disparaît en peu de jours.

Après un délai de trois mois, le liquide des tubes était toujours limpide. L'extrémité des tubes fut alors brisée dans la flamme, pour effectuer une rentrée d'air, puis scellés à nouveau.

Le lendemain un trouble apparaissait dans tous les tubes et par réensemencement sur Pomme de terre glycélinée, nous avons obtenu de belles cultures pigmentées normalement.

Nous pouvons conclure que les trois germes envisagés ne peuvent se développer sans oxygène libre et sont par conséquent aérobies stricts.

b) *Température de culture*

Les trois germes se développent bien à la température du laboratoire et à 37° C. Par contre aucun ne croît à 40° C.

c) *Températures mortelles*

La température de chauffage et la durée d'action de celle-ci ne sont pas les seuls facteurs à faire intervenir dans la détermination de la température mortelle des Bactéries. On sait que la chaleur sèche a moins d'action que la chaleur humide. D'autre part, l'espèce microbienne, la race, la souche, l'âge de la culture (présence ou absence de spores), la nature du liquide dispersif, la masse chauffée, le milieu utilisé pour mettre en évidence les germes ayant résisté à la chaleur, sont autant d'éléments dont on doit signaler l'importance au cours de telles études.

Nous avons réalisé le chauffage des germes dans des tubes capillaires qui prennent rapidement la température du thermostat. Les suspensions étaient constituées par des cultures de 48 h. en eau peptonée à 2 % de pH = 7. Un chauffage de cinq minutes à 55° C. a suffi pour déterminer la mort des trois germes.

B. — Culture sur les milieux usuels

I. — Milieux solides

Pomme de terre. — Sur Pomme de terre (glycérinée de préférence), *S. marcescens*, *S. kiliensis* et *S. esseyana* donnent en vingt quatre heures, à la température du laboratoire, de belles cultures rouges. Nous avons quelquefois remarqué un reflet métallique mais ce caractère n'est pas constant.

En vieillissant la couleur rouge se fonce pour devenir cramoisi; la couche formée par les germes à la surface de la Pomme de terre s'épaissit et devient visqueuse.

A 37° C. les cultures présentent une végétation abondante, mais après quelques passages le pigment disparaît.

Dahlia. — Les tubercules de Dahlia constituent un milieu particulièrement favorable à la croissance et à la chromogénèse des trois germes que nous étudions (Ces cultures ressemblent à celles effectuées sur Pomme de terre glycérinée).

Artichaut. — Sur ce milieu le pigment apparaît en 48 h.; après quatre jours on constate un verdissement net.

Carottes. — *S. marcescens* pousse difficilement sur ce milieu où *S. kiliensis* et *S. esseyana* ne semblent pas pouvoir se développer.

Gélatine. — Le milieu gélatiné que nous avons utilisé était composé de vingt grammes de peptone, cent cinquante grammes de gélatine et de mille grammes d'eau; son pH était ajusté à 7,8.

Les souches servant de point de départ pour les ensemencements provenaient de cultures en eau peptonée et étaient âgées de 24 h.

1° Cultures en plaques (1)

S. marcescens.

Sur un isolement en plaque de gélatine, *S. marcescens* donne naissance à de petites colonies circulaires; celles-ci grandissent rapidement et liquéfient le milieu avec formation d'un dépôt rose. La liquéfaction s'étend en quelques jours à toute la plaque.

S. kiliensis.

Cette espèce donne des colonies à bord légèrement sinueux. La liquéfaction est lente et l'apparition du pigment se fait à la périphérie des colonies.

S. esseyana.

S. esseyana donne de même des colonies arrondies qui

(1) Toutes les cultures en gélatine sont naturellement faites à la température du laboratoire, dans une pièce fraîche de préférence.

liquéfient lentement la gélatine; la pigmentation commence par le centre des colonies.

2° Culture en pique sur culot de gélatine

S. marcescens.

Deux jours après l'ensemencement sur un culot de gélatine, ce germe a déjà provoqué la formation d'un entonnoir de liquéfaction. Au cinquième jour la liquéfaction a pris la forme d'un doigt de gant au fond duquel se sont déposés des flocons blancs. Le pigment n'est apparu qu'au quatrième jour et occupait seulement la partie supérieure du liquide.

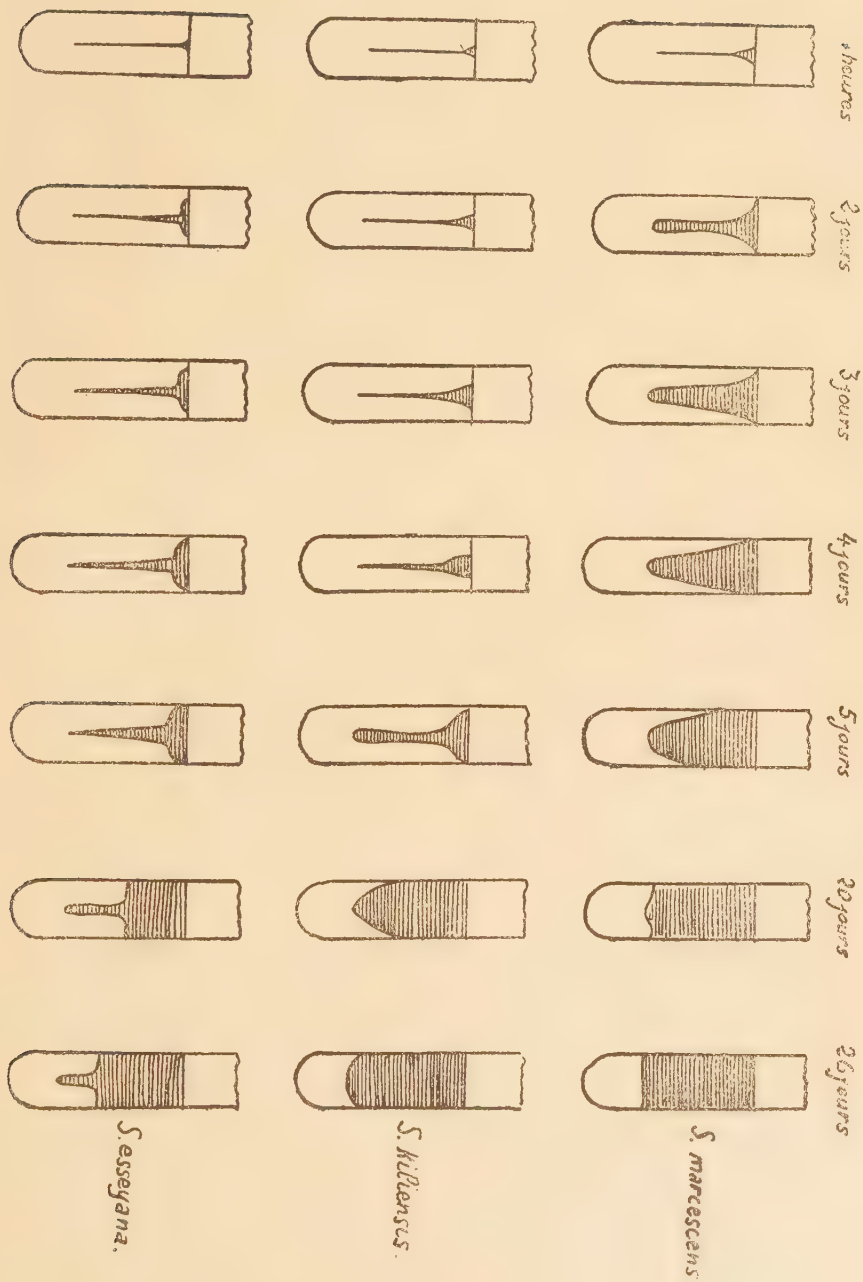
S. kiliensis.

Après trois jours ce germe a formé dans la gélatine un entonnoir de liquéfaction. Par la suite cet entonnoir change de forme; la partie supérieure s'évase comme une coupe tandis que la partie inférieure arrive à ressembler à un battant de cloche. Au vingtième jour la liquéfaction se présente comme un doigt de gant. Le pigment occupe alors toute la masse du liquide qui contient un dépôt de flocons blancs.

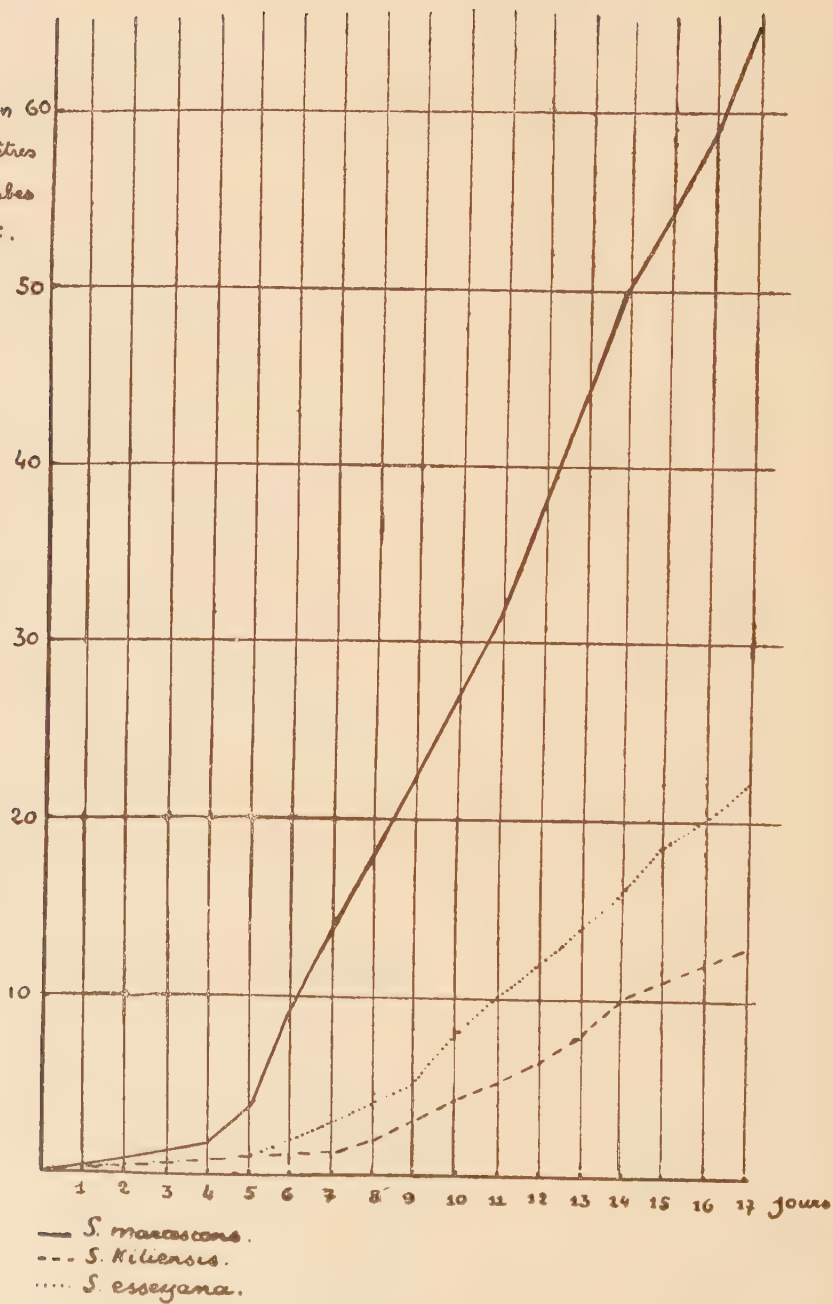
S. esseyana.

Au deuxième jour ce germe a formé à la partie supérieure une petite coupe de liquéfaction dont le bord s'évase ensuite. Après vingt jours la liquéfaction se fait

Liquéfaction de la gélatine.



Liquéfaction 60
en millimètres
dans les tubes
de Mellet.



par tranches avec formation d'un voile épais en surface. Le pigment apparait le deuxième jour sur des petits flocons qui tombent à la partie inférieure de la zone liquéfiée.

3° Mesure de la vitesse de liquéfaction

Pour effectuer ces mesures nous avons eu recours à la méthode de METT et MALFITANO. Elle consiste à remplir de gélatine des tubes de diamètre intérieur calibré puis à les plonger dans des cultures liquides des germes que l'on étudie. Grâce à une graduation en millimètres on peut noter chaque jour quelle longueur du cylindre de gélatine a été liquéfiée.

Le pH de la gélatine que nous avons utilisée était égal à 7,94 et celui de l'eau peptonée des cultures à 7,44.

La lecture du graphique indiquant les résultats de cette expérience montre que *S. marcescens* possède un pouvoir protéolytique plus fort que celui de *S. esseyana* et de *S. kiliensis*. D'autre part *S. esseyana* liquéfie plus vite que *S. kiliensis*.

Pour les trois germes, l'intensité de la liquéfaction croît avec l'âge de la culture.

Gélose. — Le milieu que nous avons employé était gélosé à 3 % et peptoné à 2 %.

1° Culture en tubes de gélose inclinée

S. marcescens.

La culture de ce germe prend l'aspect d'une bande muqueuse rougeâtre, lisse, dont la teinte varie peu de $\text{pH} = 6,6$ à $\text{pH} = 8$.

S. kiliensis.

Cette espèce croît en formant une bande muqueuse rouge orangé semblant constituée par la juxtaposition de petites colonies en forme de gouttes de rosée. Aucune différence ne peut être notée si l'on fait varier le pH du milieu de $\text{pH} = 6,6$ à $\text{pH} = 8$.

S. esseyana.

La culture de ce germe sur gélose ne présente pas de différence avec celle de *S. kiliensis* faite dans les mêmes conditions.

2° Culture en boîtes de Roux

L'aération étant plus importante dans les boîtes de Roux que dans les tubes, le pigment y apparaît d'une façon plus intense.

3° Isolements sur plaques de gélose

D'après les données de LASSEUR, MARCHAL et DUPAIX (1930), nous avons fait varier la concentration en gélose des *substrata* nutritifs utilisés. Nos observations sont résumées dans les tableaux suivants :

Concentra- tions en gélose	OBSERVATIONS faites après huit jours de culture à la température du laboratoire
	<i>S. marcescens</i> 3 % Les colonies les plus grandes mesurent cinq millimètres de diamètre ; elles sont rondes à bord régulier. 2 % Les colonies mesurent au maximum quinze millimètres de diamètre ; elles sont rondes à bord régulier. 1 % La plus grande colonie mesure dans son diamètre maximum quarante millimètres ; le bord est très irrégulier et présente des ramifications digitées.

Concentra- tions en gélose	OBSERVATIONS faites après huit jours de culture à la température du laboratoire
 3 % 2 % 1 %	<i>S. kiliensis</i> Les colonies les plus grandes mesurent quatre millimètres de diamètre et sont rondes. Le diamètre le plus grand atteint cinq millimètres et les colonies sont rondes. Le diamètre maximum atteint huit millimètres ; le bord des colonies est irrégulier.
 3 % 2 % 1 %	<i>S. esseyana</i> Les colonies sont rondes, ayant un diamètre maximum de cinq millimètres. Les colonies sont rondes, avec un diamètre de sept millimètres au maximum. Les colonies ont le bord irrégulier avec un diamètre qui atteint vingt millimètres.

Ces résultats nous montrent que les colonies sont d'autant plus étendues que la concentration en gélose est plus faible. Cette influence de la concentration de la gélose sur la forme des colonies microbiennes et sur leurs dimensions a été découverte par LASSEUR, MARCHAL et DUPAIX (1930). Ces chercheurs (1), à la suite d'une étude systématique, sont arrivés à mettre en évidence que la production de colonies rondes ou étoilées, plissées ou lisses, est sous la dépendance de facteurs simples. Elle correspond à une façon d'être du germe à des conditions déterminées. En aucune façon il ne saurait être question de variation, de dissociation ou de mutation.

LASSEUR, MARCHAL et DUPAIX avaient constaté que *S. marcescens*, ensemencé sur gélose à 3 %, y donnait naissance à des colonies rondes tandis que, sur gélose à 2 % les colonies étaient constituées par un mélange de formes rondes et de formes étoilées. Au contraire sur gélose à 1,5 % les colonies étaient toujours étoilées.

Précisant ces résultats, ces auteurs ont montré que la forme des colonies est influencée par la plus ou moins grande facilité avec laquelle les germes se meuvent à la surface de la gélose, cette facilité étant sous la dépendance de l'humidité de la surface de la gélose.

Nos résultats ne font que confirmer cette thèse.

Gélose au suc de Pomme de terre (1). — La gélose

(1) Utilisant *S. marcescens* dans leurs expériences.

(1) La composition est donnée p. 59 des Trav. du Lab. de Microbiol de Nancy 1931.

au suc de Pomme de terre constitue un milieu très favorable à la production du pigment des trois germes; le milieu se recouvre rapidement d'un enduit muqueux rouge.

Blanc d'œuf coagulé. — Nous avons étudié le pouvoir protéolytique de *S. marcescens*, *S. kiliensis* et de *S. esseyana* sur le blanc d'œuf coagulé.

A cet effet de petits cubes de blanc d'œuf coagulé sont immergés à moitié dans de l'eau peptonée contenue dans des tubes. Le tout est stérilisé puis ensemencé.

Nous avons observé les résultats suivants :

1° Avec *S. marcescens* les arêtes du cube sont émoussées après vingt quatre heures. Après quelques jours il ne reste au fond du tube qu'une masse gélatineuse rosée, d'abord opaque puis transparente.

2° Avec *S. kiliensis* la protéolyse ne se manifeste qu'après trois jours de culture. Par la suite tout le blanc d'œuf se liquéfie et prend une teinte rouge.

Avec *S. esseyana* nous avons constaté les mêmes phénomènes qu'avec *S. kiliensis*.

Sérum de Cheval coagulé. — Le sérum de Cheval convient bien à la chromogénèse des trois germes qui liquéfient ce milieu.

II. — Milieux liquides

Eau peptonée. — Ensemencés en eau peptonée à 2 % de pH = 7,6, les trois germes déterminent un trouble uniforme du liquide. Le pigment apparaît à la surface du milieu.

Les cultures de *S. kiliensis* présentent de nombreux petits flocons blanchâtres qui tombent lentement au fond du tube.

Nos observations portant sur des cultures en eau peptonée de pH différents sont résumées dans le tableau qui suit :

pH	Souches	Aspect des cultures âgées de 4 jours
6	<i>S. marcescens</i>	Liquide rose trouble surmonté d'un anneau rouge carmin.
7		Pigmentation moins intense qu'à pH = 6.
8		Liquide non pigmenté; l'anneau seul est légèrement rose.
6	<i>S. kiliensis</i>	Liquide pigmenté surmonté d'un anneau rouge carmin.
7		Anneau moins rouge qu'à pH = 6.
8		L'anneau est à peine rosé.
<i>S. esseyana.</i> — Mêmes observations que pour <i>S. kiliensis</i>		

Il semble donc qu'une légère acidité du milieu favorise la production du pigment.

Nos résultats sont en accord avec ceux de LASSEUR, DOMBRAY et DUPAIX (1931) qui cultivaient *S. marcescens* dans des eaux peptonées de pH différents. Mais tandis que nos mesures de pH ont été effectuées suivant la méthode colorimétrique, les savants que nous venons de citer employèrent la méthode électrométrique bien plus précise. Dans ces conditions, après six jours de culture, la prodigiosine était apparue dans 100 % des tubes de pH = 5,24, 50 % des tubes de pH = 7,36 et 0 % des tubes de pH = 8,77.

Nous donnerons plus loin les résultats obtenus par LASSEUR, DOMBRAY et DUPAIX avec des milieux synthétiques.

Bouillon. — Les cultures effectuées en bouillon diffèrent peu de celles faites en eau peptonée.

Lait. — Les trois germes coagulent le lait, milieu dans lequel ils donnent peu de pigment. La réaction finale des cultures est acide. La coagulation peut donc s'expliquer sans faire intervenir l'action d'une présure.

Culture en eau peptonée additionnée de différents sucres. — Nous avons recherché si l'aspect des cultures ne pouvait pas être modifié par l'addition à l'eau peptonée de diverses substances organiques telles que les sucres.

Nous avons préparé des séries de tubes contenant quatre centimètres cubes d'eau peptonée à 0,3 % de pH = 7,6; un centimètre cube de solution sucrée à 20 %; trois dixièmes de centimètre cube d'une suspension d'une culture de quarante huit heures sur gélose de pH = 7 et une petite cloche à dégagement gazeux.

Les observations faites après quarante huit heures de culture à la température du laboratoire nous ont fourni les caractères différentiels suivants :

Germes	Glycérine	Mannite	Glucose	Saccharose	Lactose	Maltose
Réaction au tournesol						
<i>S. marcescens</i>	neutre	acide	acide	acide	alcaline	acide
<i>S. kiliensis</i>	neutre	acide	acide	acide	neutre	acide
<i>S. esseyana</i>	neutre	neutre	acide	acide	acide	alcaline
Production de gaz						
<i>S. marcescens</i>	0	0	0	0	0	0
<i>S. kiliensis</i>	0	0	+	+	0	+
<i>S. esseyana</i>	0	+	+	+	+	+

Nous avons aussi remarqué qu'en milieu acide le pigment est rouge carmin tandis qu'en milieu alcalin il est rouge vermillon.

Culture sur les milieux synthétiques. — Sur le milieu synthétique L¹ de LASSEUR (1) les trois germes offrent un développement abondant et une magnifique coloration rouge du liquide nutritif. Une étude très précise de ces cultures a été faite par LASSEUR, DOMBRAY et DUPAIX (1931).

Cultivant *S. marcescens*, *S. kiliensis* et *S. esseyana* sur des milieux L¹ (1) de pH différents, ces auteurs ont noté l'aspect des cultures après des temps variables. Le tableau ci-dessous, emprunté au travail de LASSEUR, DOMBRAY et DUPAIX (1931) schématise leurs observations après huit jours de culture :

(1^e Milieu L¹ de LASSEUR : eau distillée 100, apsaragine 0,9, glycérine 2,5, phosphate dipotassique 0,25, sulfate de magnésie 0,50, chlorure de calcium 0,04, sulfate ferreux 0,01.

pH du milieu de culture	Aspect des cultures âgées de huit jours		
	<i>S. marcescens</i>	<i>S. kiliensis</i>	<i>S. esseyana</i>
4,26 ..	30 % des tubes : trouble. 70 % des tubes pas de végétation.	Pas de végétation.	Pas de végétation.
5,40 ..	Anneau rouge coloration rose du liquide.	Pas de végétation.	10 % des tubes : trouble avec trace de pigment.
6,09 ..	Anneau rouge coloration rose du liquide.	Voile rose ou rouge.	Voile rouge carmin.
6,44 ..	Pas d'anneau rouge; 60 % des tubes ont leur liquide rose.	Voile carmin.	Anneau rouge.
7,64 ..	Pas d'anneau rouge; 20 % liquide très faiblement rose.	Voile rouge.	Culture incolore.

Bien que les trois germes ne se comportent pas tous de la même manière suivant le pH du milieu de culture on peut constater qu'une réaction légèrement acide (de pH 5 à pH 6) favorise la production du pigment.

C. — Action chimique sur les milieux de culture

a) *Production d'indol*

Cultivés sur un milieu peptoné à 2 % (peptone CHAPOTEAUT), additionné de phosphate de soude et de sulfate de magnésie, les trois germes n'ont pas formé d'indol (Réactions de SALKOWSKI et d'ERLICH).

b) *Réduction des nitrates*

En pratiquant la réaction de GRIESS sur des cultures en eau peptonée nitratée nous avons pu mettre en évidence la réduction des nitrates en nitrites par *S. marcescens*, *S. kiliensis* et *S. esseyana*. Toutefois cette réduction ne va pas jusqu'à la formation d'azote.

c) *Production d'hydrogène sulfuré*

Pour rechercher la présence d'hydrogène sulfuré dans nos cultures nous avons utilisé le procédé suivant (procédé de HOLLANDE) : dans des fioles d'ERLENMEYER on

introduit 50 cm³ d'eau peptonée à 2 % de pH = 7,6, on bouche les tubes avec des tampons de coton, capuchonne puis stérilise 1/2 heures à 115° C.

D'autre part on prépare des bouchons s'adaptant exactement sur les fioles; à ces bouchons on fixe des bandes de papier filtre fort, préalablement trempées dans du sous acétate de plomb puis séchées. Les bouchons munis de leur papier réactif sont stérilisés dans des grands tubes.

On ensemence les fioles d'eau peptonée sur lesquelles on adapte alors les bouchons, le papier filtre arrivant à un centimètre de la surface du liquide. Le noircissement du papier indiquera la formation d'hydrogène sulfuré.

Après douze jours de culture nous avons constaté que le papier réactif avait été noirci sur un millimètre pour *S. marcescens*, sur cinq centimètres pour *S. kiliensis* et sur six centimètres pour *S. esseyana*.

Les trois germes produisent donc de l'hydrogène sulfuré mais avec des intensités différentes.

CHAPITRE III

ACTION ANTISEPTIQUE DE L'ACIDE PHÉNIQUE

On exprime en général le pouvoir antiseptique d'une substance en fonction du pouvoir antiseptique du phénol. C'est la raison pour laquelle, adoptant la technique de RIDEAL et WALKER, en la modifiant légèrement, nous avons essayé de déterminer l'action bactéricide de l'acide phénique pur (1), sur les trois germes qui nous occupent.

Récemment H. REGNIER et Mlle LAMBIN (1931) ont montré que l'action de l'acide phénique est celle qui se laisse le moins influencer par la présence d'albumine et des substances du bouillon peptoné.

Dans leurs belles recherches ces savants précisent une méthode permettant de rechercher la valeur absolue d'un antiseptique. Il en résulte que toute mesure de pouvoir

(1) Les crésols qui accompagnent souvent le phénol ont un pouvoir bactéricide supérieur à celui de l'acide phénique pur.

antiseptique doit se faire en définissant parfaitement la substance chimique utilisée, le nombre et la qualité des microbes, le milieu intermédiaire.

Voici le détail de la méthode que nous avons adoptée :

On prépare des suspensions homogènes (au sens bactériologiques du mot) de chacun des germes, à cinq milliards par centimètre cube, à partir de cultures de quarante huit heures sur gélose de $\text{pH} = 7,2$.

Dans une série de tubes on dépose: 9 cm³ de solution de peptone CHAPOTEAUT à 2 % de $\text{pH} = 7,2$, trois dixièmes de centimètre cube de suspension microbienne, puis des doses croissantes d'acide phénique. On amène tous les tubes au même volume de liquide avec de l'eau physiologique.

Après quatre jours de culture, à la température du laboratoire, on note quels sont les tubes où aucune végétation n'est visible.

Puis on réensemence 0 cm³ 3 du liquide de ces derniers tubes dans de nouveaux tubes d'eau peptonée exempts d'acide phénique. On note les tubes où apparaît une végétation.

De cette façon nous avons déterminé les doses infertilisantes et les doses mortelles indiquées dans le tableau suivant :

Souches	Concentration en acide phénique	
	Doses infertilisantes	Doses mortelles
<i>S. marcescens</i> ..	de 2 à 2,5 0/00	3 0/00
<i>S. kiliensis</i>	de 1 à 1,25 0/00	1,50 0/00
<i>S. esseyana</i>	de 1,25 à 2 0/00	2,50 0/00

Dose infertilisante : dose suffisante pour empêcher les germes de se multiplier mais insuffisante pour les tuer.

Dose mortelle : dose suffisante pour tuer les plastides bactériennes.

Nous voyons que les trois germes présentent des résistances différentes vis à vis de l'acide phénique.

CHAPITRE IV

ETUDE DES CARACTÈRES SÉROLOGIQUES

Après avoir exposé les caractères morphologiques et culturaux de *S. marcescens*, *S. kiliensis* et de *S. esseyana* nous arrivons à l'étude de leurs caractères sérologiques.

A cet effet nous avons préparé les sérums nécessaires en prenant le Lapin comme animal d'expérience.

A. — Préparation des sérums

Nous avons utilisé la méthode du Laboratoire de Microbiologie pour préparer nos sérums. Le mode opératoire est le suivant :

a) Préparation des suspensions microbiennes à injecter

Les Bactéries servant à la préparation des suspensions proviennent de cultures effectuées sur plaques de gélose

peptone de pH = 7 (1). Quarante huit heures après l'ensemencement l'eau de condensation est rejetée. Les germes sont alors mis en suspension dans l'eau physiologique et lavés trois fois (2). Les corps microbiens sont ensuite agités dans des flacons contenant des billes de verre jusqu'à ce que le microscope indique une dissociation suffisante des colonies élémentaires. Les agglomérats qui n'ont pu être détruits sont éliminés par une centrifugation de quelques secondes. On obtient enfin un léger culot de corps microbiens surmonté d'un liquide opalescent qui constitue la suspension mère.

Cette suspension est amenée à une concentration convenable par addition d'eau physiologique. Après homogénéisation on distribue en ampoules que l'on chauffe à une température assez basse pour ne pas déterminer une modification du pouvoir antigène, mais suffisante pour tuer les germes.

(1) Cultures effectuées en boîtes de Roux à la température du laboratoire.

(2) Le lavage s'effectue ainsi : les suspensions sont centrifugées, le liquide surmontant le culot de corps microbiens est rejeté et remplacé par de l'eau physiologique ; après mise en suspension on centrifuge à nouveau, décante, remet en suspension dans l'eau physiologique et ainsi de suite de manière à effectuer trois lavages.

b) *Injection aux animaux*

Les Lapins recevaient de onze à seize injections de corps microbiens (une injection était faite par semaine).

Les inoculations à doses croissantes (0,5 à 20 cm³) se faisaient d'abord par voie sous-cutanée puis par voie intrapéritonéale, avec des germes morts pour les six premières injections et avec des germes vivants pour les suivantes. Toutefois il est impossible de donner un protocole à suivre à la lettre car l'apparition de phénomènes morbides impose souvent des modifications, soit dans les intervalles qui séparent les piqûres, soit dans les doses à injecter.

Nous avons pu constater un fait déjà signalé par LASSEUR, à savoir que les germes saprophytes, contrairement aux germes pathogènes, amènent souvent la perte des animaux au cours de leur préparation.

c) *Obtention des sérums*

Huit jours après la dernière injection, le sang de l'animal est recueilli par saignée aseptique. Le sang est reçu dans des vases stériles et, lorsque les caillots se sont suffisamment rétractés, le sérum est décanté puis réparti aseptiquement en ampoules stériles que l'on chauffe ensuite 30' à 56° C.

B. — Essais d'agglutination

Dans une série de tubes A, B, C, D on distribue 1 cm³ d'une suspension (1) contenant 8 milliards de germes au cm³

D'autre part le sérum agglutinant est dilué avec de l'eau physiologique à des taux qui varient du 1/20° au 1/100000°.

Au tube A on ajoute 1 cm³ de sérum dilué au 1/20°, au tube B 1 cm³ de sérum dilué au 1/50° et ainsi de suite.

Après les avoir bien mélangés, on porte les systèmes agglutinants à l'étuve à 37° C. Les examens à l'œil, à la loupe et au microscope se font après 30', 2 h., 4 h., etc.

Le tableau ci-dessous résume nos résultats :

(1) Suspension homogène de germes lavés.

Serum utilisé	Suspension bactérienne	Dilution limite d'agglutination constatée à la loupe après 4 h. de séjour à 37° C
<i>S. marcescens</i> .. (2)	<i>S. marcescens</i> ..	1/20000
	<i>S. kiliensis</i>	1/100
	<i>S. esseyana</i>	1/100
<i>S. kiliensis</i>	<i>S. kiliensis</i>	1/25000
	<i>S. marcescens</i> ..	1/40
	<i>S. esseyana</i>	1/100
<i>S. esseyana</i>	<i>S. esseyana</i>	1/32000
	<i>S. marcescens</i> ..	1/100
	<i>S. kiliensis</i>	1/50

Nous voyons que *S. marcescens*, *S. kiliensis* et *S. esseyana* sont de bons antigènes permettant d'obtenir des sérums agglutinant à un taux élevé.

D'autre part la présence de coagglutinines indique une « parenté humorale » au sens de BOHN et DEZEWINA entre *S. marcescens*, *S. kiliensis* et *S. esseyana*.

Toutefois la dilution limite d'agglutination pour le germe homologue étant bien supérieure à la dilution limite d'agglutination pour les deux autres germes nous disposons d'un excellent moyen de les différencier.

(2) Le sérum *S. marcescens* nous a été obligeamment procuré par M. le Professeur LASSEUR, le Lapin que nous préparions avec *S. marcescens* ayant péri à la suite de la septième injection.

CHAPITRE V

PRÉCIPITATION DES PLASTIDES PAR L'ACIDE SULFURIQUE ET PAR LE SULFATE D'ALUMINE

Dans une longue série d'études sur la précipitation des plastides microbiennes par les ions à charge positive, LASSEUR et ses Collaborateurs DUPAIX et DOMBRAY (1931) ont montré que cette action pouvait varier d'une espèce à l'autre.

Pensant trouver là un moyen supplémentaire de diagnose nous avons étudié l'action comparative de l'acide sulfurique et du sulfate d'alumine sur la stabilité des suspensions de *S. marcescens*, *S. kiliensis* et de *S. esseyana*.

Une série de tubes à agglutination reçoivent un centimètre cube de suspension de germes lavés (1) puis un

(1) Les lavages et les suspensions se font avec de l'eau distillée.

centimètre cube de dilutions croissantes de solution précipitante. Les systèmes précipitants sont homogénéisés et portés à l'étuve à 37° C. Après des temps variables des observations sont faites à la loupe.

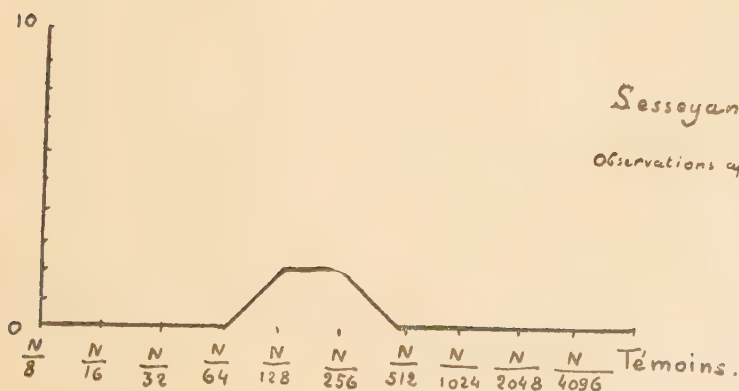
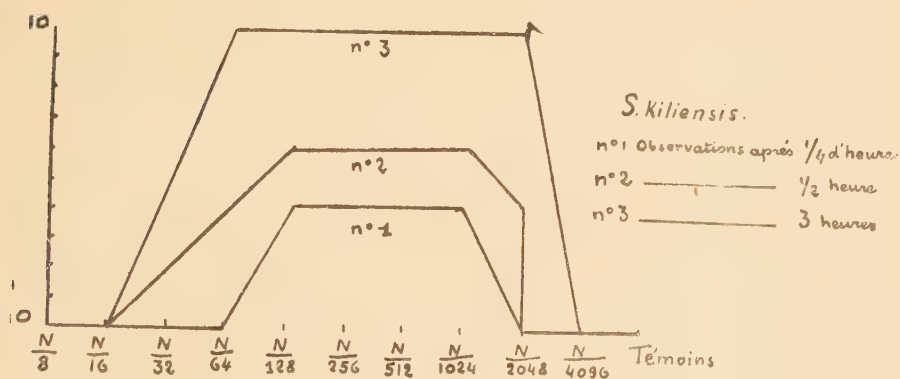
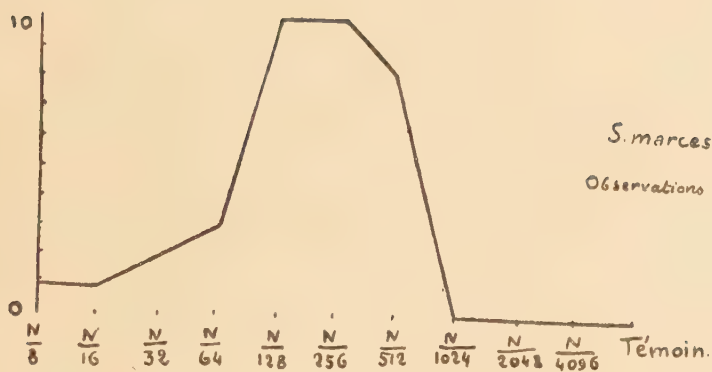
A. — Action précipitante de l'acide sulfurique

Les différentes solutions se font à partir d'une solution normale d'acide sulfurique (N).

Nos observations sont consignées sous forme de courbes où sont portées en abscisse les dilutions finales et en ordonnée un indice de précipitation allant de 0 à 10.

- 0 = suspension homogène
- 2 = flocons très fins, pas de précipité
- 4 = flocons plus gros, pas de précipité
- 6 = liquide louche, flocons et précipité
- 8 = liquide clair, flocons et précipité
- 10 = dépôt, liquide clair, précipitation totale

Chaque expérience comporte un tube témoin contenant un centimètre cube de suspension microbienne, et un centimètre cube d'eau distillée.



Les plastides des trois germes sont précipitées par l'acide sulfurique et la zone de précipitation maxima se trouve placée entre les dilutions N/129 et N/256.

Seule la vitesse de précipitation varie selon les germes. Alors que *S. marcescens* et *S. kiliensis* sont complètement précipités en trois heures, *S. esseyana*, au bout de ce temps, ne présente que la formation de flocons très fins.

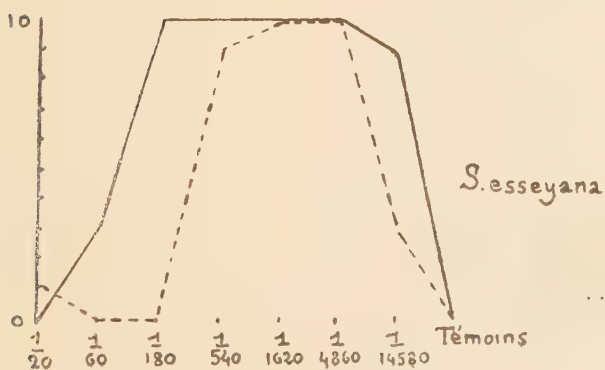
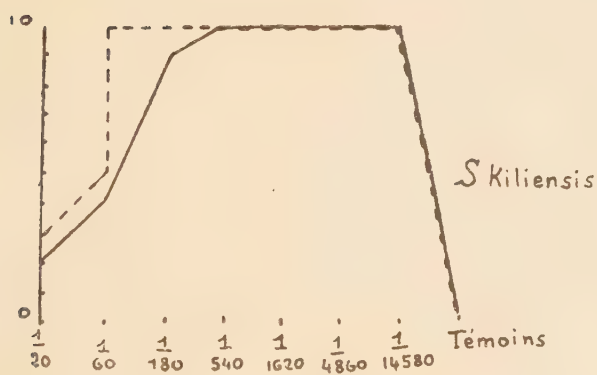
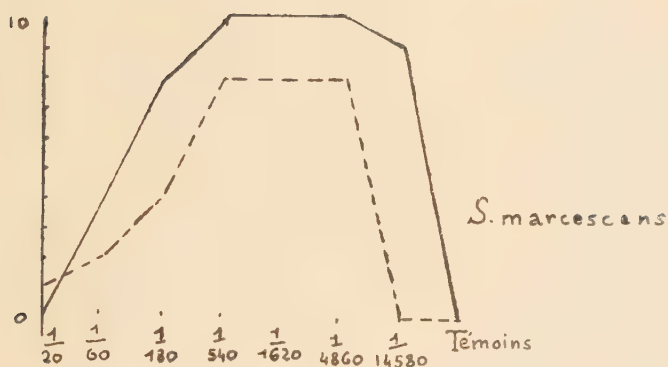
B. — Action précipitante du sulfate d'alumine

Nous avons opéré avec le sulfate d'alumine comme avec l'acide sulfurique (1).

De plus nous avons fait des essais sur des suspensions chauffées 1/2 heure à 56° C.

Nos observations, faites après 2 heures 1/2 de séjour à l'étuve à 37° C. des systèmes précipitants, sont indiquées dans les courbes suivantes, établies de la même manière que celles données précédemment pour l'action de l'acide sulfurique.

(1) Les dilutions de sulfate d'alumine vont du 1/10° au 1/4860°.



— Germes non chauffés.
 germes chauffés.

La précipitation des trois germes présente un maximum à la dilution de 1/1620. Il semble que le chauffage n'apporte pas de modifications appréciables.

Nos essais de précipitation ne nous ont donc pas fourni d'éléments appréciables de différenciation entre *S. marcescens*, *S. kiliensis* et *S. esseyana*.

TROISIÈME PARTIE

CONTRIBUTION A L'ETUDE
DU
MÉCANISME DE L'ACTION DU FER
DANS LA CHROMOGENÈSE DE S. marcescens

CHAPITRE I

APERÇU HISTORIQUE

Le premier document scientifique relatif à l'influence de l'élément fer sur la chromogénèse des Bactéries est dû à notre Maître, M. le Professeur LASSEUR. L'observation de cultures de *B. chlororaphis* en milieu dépourvu de fer et les résultats obtenus en effectuant des apports tardifs de fer dans ces cultures lui permirent de démontrer que la « *présence de fer dans les milieux chimiquement définis est indispensable à la production de la chlororaphine.* » (LASSEUR 1911, p. 63).

De plus, des Bactéries du groupe *subtilis-mesentericus*, jusqu'alors considérées comme achromogènes, grâce à la présence de fer dans leur milieu de culture, ont pu donner naissance à un pigment. (LASSEUR et THIRY 1911).

Sous l'impulsion de LASSEUR, ou en collaboration avec lui, BROCCQUIN-LACOMBE (1913), NEPVEUX (1920), VERNIER (1924), PALGEN (1923), THIRY et DUPAIX (1930) ont confirmé cette action du fer et l'ont précisée.

Dans son étude sur la prodigiosine, BORTELS (1927) a observé des faits analogues à ceux décrits par les précédents auteurs. *S. marcescens*, cultivé sur des milieux synthétiques dépourvus de fer, donne des cultures incolores. Si, à de telles cultures, on ajoute une quantité convenable de sel ferreux, on observe l'apparition immédiate d'une coloration rappelant celle de la prodigiosine.

BORTELS a remarqué que cette coloration était plus intense lorsque les cultures contenaient une quantité de fer de l'ordre de 0,00001 % et, là encore, les conclusions du savant allemand sont conformes à celles formulées antérieurement par LASSEUR.

L'influence de l'élément fer sur la production de certains pigments bactériens paraissant établie par toute une série de travaux, nous ne serions pas revenus sur ce sujet, sous la direction de notre Maître, sans l'observation d'un fait nouveau :

Une culture de *S. marcescens* en milieu L1, dépourvu de fer, incolore par conséquent, fut renversée par mégarde. Le tube de culture fut redressé, marqué d'une croix pour le reconnaître, et remis à l'étuve (à 20° C.). Or, le lendemain, le bouchon de coton était rouge carmin sur une grande surface, alors que le liquide de culture était resté incolore.

Nous demandant si ce fait inattendu n'était pas de nature à éclaircir le mécanisme de l'action du fer dans la chromogénèse de *S. marcescens*, nous avons été amené à effectuer une série d'expériences que nous allons relater.

CHAPITRE II

NOUVELLES RECHERCHES ⁽¹⁾

Avant d'aborder l'exposé de nos recherches, nous commencerons par définir le milieu de culture que nous avons utilisé, et qui est le milieu de L1 de LASSEUR de formule :

Asparagine	0,900
Glycérine	2,500
Phosphate bipotassique	0,250
Sulfate de magnésie	0,500
Chlorure de calcium	0,040
Sulfate ferreux	0,010
Eau distillée q. s. p.	100 cm ³

Des traces d'éléments chimiques étant capables d'influencer fortement certaines fonctions microbiennes et en

(1) Extrait de LASSEUR, COMBE, DUPAIX, Trav. du Lab. Microbiol., Fasc. IV, p. 45-55 1931.

particulier la chromogénèse, on conçoit qu'il a fallu s'assurer de la pureté des produits employés.

L'eau distillée provenant d'alambics en cuivre rouge a été soumise à une nouvelle distillation dans un appareil dont le tube réfrigérant est en étain (appareil de BOURDILLON modifié par GIRARDET 1923).

La glycérine a été distillée à 174-175° C. sous H = 11 mm. par notre vénéré Maître, M. le Professeur FAVREL (1).

La purification des autres produits a été faite par M. le Professeur LASSEUR lui-même.

L'étude de l'influence de traces d'éléments sur la nutrition des Bactéries comporte de nombreuses causes d'erreur, signalées par RAULIN (1870) et DUCLAUX (1898), et précisées par G. BERTRAND et ses élèves (2).

Etant données ces causes d'erreur, on ne peut donc pas affirmer que l'en opère en l'absence rigoureuse de fer ou de cuivre, mais on peut assurer que l'on s'est efforcé de réduire le plus possible l'apport accidentel de fer par

(1) Bien que trente années d'enseignement lui aient donné droit à un repos bien mérité, M. le Professeur Favrel n'a pas abandonné le Laboratoire et s'adonne toujours à la recherche scientifique.

(2) Ainsi que le fait justement remarquer A.-A. Guntz dans une étude sur le phosphorogène (1931) « *l'action d'« impondérables »* cesse d'être une fiction du langage et passe dans les faits les plus courants ».

les éléments constitutifs du milieu nutritif. Sous ces réserves et pour des raisons didactiques, nous emploierons cependant l'expression « *milieu sans fer* » (2).

La semence prélevée sur les milieux usuels pouvant apporter une quantité de fer non négligeable, il est indispensable d'effectuer au moins trois passages sur milieu sans fer. Ce n'est guère que vers le troisième passage que les résultats s'inscrivent toujours dans le même sens.

Il faut évidemment éviter les causes d'apports accidentels de fer tels que le nettoyage des tubes avec des tiges de fer, la stérilisation au four des vases de culture non protégés par une enveloppe de papier, l'utilisation de flammes provenant de becs de fer ou traversant des toiles métalliques (amiante et fer), etc.

On ne peut énumérer toutes les causes d'erreur à éviter. Elles sont en partie fonction de l'installation dont on dispose. Cependant il faut convenir que l'ingéniosité peut souvent remplacer le luxe de certains laboratoires.

Résultats expérimentaux

L'étude des phénomènes d'oxydoréduction semble donner quelque intérêt à l'hypothèse où l'on considère le fer comme un porteur d'oxygène. Dans cette conception des

(2) Le lecteur voudra bien sous-entendre : milieu dans lequel on n'a fait volontairement aucun apport de fer.

faits, l'aspect des cultures devrait varier avec le degré d'aération du liquide nutritif. C'est pour cela que nous avons effectué des cultures en couche épaisse (cultures en tubes) et en couche mince (cultures en ballons ou en Erlenmeyers). Nous avons également essayé d'augmenter, par addition de billes de verre, la surface du liquide exposée à l'air.

Enfin, nous avons réalisé une aération ménagée de la culture par un passage lent d'air filtré. Ce sont ces tentatives que nous allons résumer dans le tableau ci-dessous :

Première série d'expériences

Désignation des vases de culture	Epaisseur de la couche liquide en mm.	Aspect de la culture au 7 ^e jour	Apport tardif de fer	Intensité de la coloration
Tube	50	Trouble, pas de pig- ment.	Coloration violet- rouge instantanée.	5
Ballon	40	Trouble, pas de pig- ment.	Coloration violet- rouge instantanée.	8
Erlenmeyer (lit de billes de verre)	5	Trouble, pas de pig- ment.	Coloration violet- rouge instantanée.	10
Tube (aération ména- gée)	50	Trouble, pas de pig- ment.	Coloration violet- rouge instantanée.	

Remarque I. — Les colorations les plus nettes s'observent en ajoutant 2 gouttes de solution de sulfate ferreux (à 1 %) à 8 cm³ de culture.

Remarque II. — Les billes de verre ayant un diamètre de 6 à 7 millimètres, l'épaisseur de la couche liquide doit être inférieure à ce diamètre. Dans ces expériences, l'épaisseur de la couche est de 5mm.

L'examen du tableau ci-dessus montre que *S. marcescens* ne produit pas de pigment en l'absence de fer, mais que la production de la substance mère de la prodigiosine augmente avec l'aération de la culture, quel que soit le mode d'aération adopté.

Deuxième série d'expériences

Dans une seconde série d'expériences, nous réalisons systématiquement le retournement des tubes de cultures incolores effectuées sur milieu dépourvu de fer. Le contact du liquide et du coton est de faible durée, quelques secondes à une minute, puis le tube est redressé et abandonné à la température ordinaire.

Lorsque l'on opère sur des cultures d'âge convenable (de 4 à 7 jours) tous les cotons deviennent rouge garmin. Les cultures trop jeunes ou trop âgées peuvent ne pas montrer ce phénomène. Il faut, en effet, que la substance mère de la matière colorante ait le temps de se former et il est indispensable, en raison de son instabilité, qu'elle n'ait pas le temps de se détruire.

Pour expliquer la coloration rouge du coton, il semble

tout naturel de l'attribuer au fer pouvant exister dans la fibre végétale. Mais, si les choses se passent bien ainsi, une complication regrettable surgit, car il faut renoncer à l'emploi de coton pour boucher les récipients destinés à la culture des Bactéries en milieu dépourvu de fer.

Il faut donc vérifier si les brins de coton qui se détachent du tampon constituent un apport notable de fer.

A cet effet, du liquide L¹ sans fer est distribué dans des tubes en verre résistant (Pyrex, Sibor, etc.) nettoyés rigoureusement, en prenant toutes les précautions nécessaires pour éviter les apports accidentels de fer. Les tubes sont distribués en deux groupes A et B. Dans les tubes du groupe A, on immerge, durant quelques minutes, des petits tampons de coton stérile. Les tubes bouchés avec du coton sont stérilisés puisensemencés après refroidissement. Les tubes du groupe B servent de témoin. Tous les tubes du groupe A restent incolores comme les tubes du groupe B. Les fragments de coton qui se détachent des tampons obturant les vases de culture ne doivent donc pas être considérés comme une cause d'erreur importante dans l'étude de l'action du fer sur la production des pigments microbiens.

Il y a plus. En prolongeant durant des heures l'immersion du coton dans le liquide L¹ dépourvu de fer, on n'obtient jamais une production sensible de prodigiosine.

Lorsque l'on met un tampon de coton en contact avec une solution de sulfocyanures alcalins, on observe parfois une faible teinte rose du coton, d'autres fois la fibre

végétale ne présente aucune coloration. Même lorsqu'elle existe, la faible coloration due au cyanure contraste singulièrement avec la couleur rouge carmin intense du coton ayant été en contact avec des cultures incolores. On peut objecter, il est vrai, que la substance mère de la prodigiosine est un révélateur du fer plus sensible que l'anion SCN.

L'hypothèse qui attribue le « rougissement » du coton à la présence de fer (1) dans la fibre végétale n'est donc pas démontrée.

Et il est tout aussi logique d'admettre que le coton n'agit qu'en augmentant la surface d'oxydation du liquide qui l'a imprégné.

Si cette conception est exacte, on doit pouvoir remplacer le coton par des substances absorbantes les plus diverses. C'est ce que nous avons tenté de faire en immergeant dans les cultures sans fer, donc incolores, l'extrémité de bandelettes de papier filtre (dit filtre sans cendres) analogues à celles que l'on emploie dans l'analyse capillaire. Ces bandelettes de papier ne donnent aucune coloration en présence de solutions de sulfocyanure alcalin (2).

Nous avons employé de très nombreux dispositifs. Les uns permettent la stérilisation du papier en même temps

(1) Libre ou facile à déplacer.

(2) L'intensité de la coloration obtenue avec l'anion S C N est fonction de la concentration S C N et en immergeant l'extrémité d'une bande de papier dans une solution de sulfocyanure alcalin, on arrive à concentrer considérablement l'anion S C N dans certaines régions de la bande.

que celle du liquide. L'extrémité de la bande de papier est immergée après un laps de temps convenable. Toutes ces opérations sont effectuées en s'inspirant des principes de l'analyse capillaire. De plus elles sont réalisées à l'intérieur d'un tube bouché, elles sont donc rigoureusement aseptiques. Dans d'autres expériences, on a immergé, aussi aseptiquement que possible, l'extrémité de bandelettes de papier stérilisées séparément.

Après 24 ou 48 heures de contact avec le liquide, le papier montre le plus souvent des plaques rouge carmin de 5 à 50 millimètres de hauteur.

Dès que l'on veut interpréter ces résultats, on se heurte à une nouvelle complication. En effet, la coloration des bandelettes de papier peut s'expliquer de deux façons différentes :

1° La prodigiosine existe dans le milieu de culture en quantité trop faible pour manifester sa présence par une coloration du *substratum* nutritif, mais elle peut s'accumuler par adsorption dans des zones limitées de l'adsorbant ainsi que cela s'observe dans l'analyse capillaire.

2° Le papier agit comme support qui augmente la surface d'oxydation du liquide nutritif. . . .

La première hypothèse paraît peu vraisemblable pour la raison suivante: les hauteurs d'ascension du colorant préformé, si colorant il y a, sont variables pour les mêmes conditions d'expérience. De plus les plages colorées ne débutent jamais qu'à 5 ou 10 millimètres au-dessus de la surface du liquide.

Ces faits ne concordent guère avec ce que l'on a l'habitude d'observer dans l'analyse capillaire.

D'ailleurs, il est très facile de démontrer que le papier n'agit pas en accumulant le colorant préformé; il suffit pour cela d'opérer comparativement dans une atmosphère d'azote et dans l'air atmosphérique.

A cet effet des cultures incolores, âgées de 4 à 7 jours, sont divisées en deux groupes A et B. Dans les tubes des groupes A et B on immerge des bandelettes de papier. Les tubes du groupe A sont abandonnés tels quels à la température du laboratoire. Les tubes du groupe B sont introduits dans des tubes de plus grandes dimensions. Le tube extérieur est étiré et relié à un robinet à trois voies qui est mis successivement en communication avec une trompe à vide et une bombe d'azote. On effectue alors sept fois le vide suivi de rentrée d'azote, puis on scelle au chalumeau.

Après deux ou trois jours, les bandelettes de papier du groupe A montrent des plages rose ou rouge carmin plus ou moins étendues. Tous les tubes du groupe B offrent des bandelettes de papier rigoureusement blanches. Si, à ce moment on coupe le tube extérieur pour permettre l'entrée de l'air dans les tubes du groupe B, on observe en 24 ou 48 heures l'apparition de plages colorées en rouge sur toutes les bandelettes de papier des tubes du groupe B.

En l'absence d'oxygène, les papiers restent donc incolores. Si l'apparition des plages rouges devait être attri-

buée à l'accumulation de la prodigiosine préformée, cette accumulation devrait se produire tout aussi bien en présence d'azote que dans l'air atmosphérique, ce qui n'est pas.

Nous venons d'éliminer une hypothèse, mais il nous en reste toujours deux :

1° Celle où l'on attribue l'apparition des plages colorées au fer existant dans le papier ou dans le coton.

2° L'hypothèse où l'on considère coton et papier comme des substances augmentant la surface d'adsorption du liquide nutritif.

Ce qui nous conduit à effectuer avec des tampons de coton des expériences analogues à celles que nous avons réalisées avec des bandes de papier.

Des tubes à essai renfermant du milieu L' non additionné de fer etensemencés depuis 4 à 7 jours sont introduits dans des tubes de 18 millimètres de diamètre sur 200 millimètres de hauteur, ce tube extérieur est étiré et relié à un robinet à trois voies qui les met successivement en communication avec une trompe à vide et une bombe d'azote. On effectue alors sept fois le vide, suivi de rentrée d'azote.

Dans ces conditions d'expérience, même après 48 heures, le coton qui avait été au contact de la culture incolore, ne présente aucune coloration. Si, à ce moment, on chasse l'azote et le remplace par l'air, le coton non modifié présente au bout de 24 ou 48 heures une belle coloration rouge carmin.

En résumé, l'ensemble des faits exposés semble montrer que le fer agit surtout comme vecteur d'oxygène. Il est possible, en effet, d'obtenir la production de la prodigiosine, sinon en l'absence de fer (c'est un point que l'on ne peut jamais affirmer), du moins en présence de quantités non décelables par les réactifs chimiques. Il suffit pour cela de réaliser une oxydation convenable de la culture incolore où s'est développé *S. marcescens*.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

1°) D'après les règles de la nomenclature et d'après ses caractères morphologiques et cultureux, le germe étudié pour la première fois par BIZIO (1823), plus connu sous le nom de *Bacillus prodigiosus* FLÜGGE 1886, doit être appelé *Serratia marcescens* BIZIO 1823.

2°) Pour des raisons du même ordre, nous avons adopté le terme *Serratia kiliensis* C. S. A. B. 1923 pour désigner le germe isolé et nommé par BREUNIG (1888) *Bacterium h.*

3°) Le *Bacille rouge d'Essey* (LASSEUR 1915) possédant les caractères du genre *Serratia*, nous l'avons nommé *Serratia esseyana* COMBE 1933 (*esseyana* rappelant son origine).

4°) Dans une culture sur gélose de pH = 7, âgée de 48 heures, les plastides de *S. marcescens* se présentent sous une forme ovale. Dans les mêmes conditions, *S. kiliensis* et *S. esseyana* apparaissent sous une forme bacillaire plus allongée.

5°) Les plastides provenant de cultures sur Pomme de terre glycinée, colorées à la fuchsine formolée et examinées entre lame et lamelle ont les dimensions suivantes ;

a) *S. marcescens*. — Sur 100 germes d'une culture âgée de 2 jours 9 (fréquence maxima observée) sont ainsi définis : $L = 1 \mu 5$ et $l = 0 \mu 8$ (rapport de LASSEUR $L/l = 1,8$); d'autre part L varie de $1 \mu 3$ à $2 \mu 3$ et L/l de 1,3 à 3,2 (1).

b) *S. kiliensis*. — Sur 100 germes d'une culture de 24 heures 8 (fréquence maxima observée) sont ainsi définis : $L = 1 \mu 9$ et $l = 0 \mu 6$ (rapport de LASSEUR $L/l = 3,1$); d'autre part L varie de $1 \mu 5$ à 4μ et L/l de 2,5 à 6,6.

c) *S. esseyana*. — Sur 100 germes d'une culture âgée de 2 jours 5 (fréquence maxima observée) sont ainsi définis : $L = 2 \mu 9$ et $l = 0 \mu 7$ (rapport de LASSEUR $L/l = 4,1$); d'autre part L varie de $1 \mu 5$ à $6 \mu 8$ et L/l de 2,1 à 8,5.

6°) Examinés entre lame et lamelle, à un grossissement moyen, ces trois germes paraissent incolores s'ils sont isolés et légèrement rosés s'ils sont réunis en amas. Un très fort grossissement permet de distinguer dans les plastides de *S. marcescens* des grains rouge rubis ou rouge sombre, de taille et en nombre variables, disposés de différentes manières.

7°) Colorés suivant la méthode de GRAM, le temps d'action du violet de gentiane et celui du Lugol étant de deux minutes, les plastides de *S. marcescens* et *S. kiliensis*

(1) L = longueur de la plastide, l = diamètre du cylindre plus ou moins régulier formé par la plastide.

sont complètement décolorées par l'alcool à 95° en 9", celles de *S. esseyana* en 7" (germes provenant de cultures de 24 heures, sur gélose peptone de pH = 7).

8°) L'examen entre lame et lamelle de cultures en eau peptonée de pH = 7, âgées de 48 heures, permet d'observer une mobilité rapide pour les plastides de *S. marcescens* et de *S. esseyana*. Au contraire, *S. kiliensis* se meut très lentement.

9°) Les trois germes sont pourvus de fouets moteurs diffus.

10°) Ce sont des germes aérobies stricts.

11°) Leur développement s'effectue bien à la température du laboratoire. Un chauffage de cinq minutes à la température de 55° C. suffit pour les tuer.

12°) La plupart des milieux de cultures usuels conviennent à leur développement.

13°) Sur ces milieux, *S. marcescens*, *S. kiliensis* et *S. esseyana* donnent naissance à un pigment rouge, à la température du laboratoire mais pas à 37° C.

14°) Les trois germes liquéfient la gélatine; cette action protéolytique n'a pas la même intensité pour chacun d'eux; par ordre de vitesse décroissante de liquéfaction on peut les classer de la façon suivante: *S. marcescens*, *S. esseyana*, *S. kiliensis*.

15°) Après 48 heures de culture dans des milieux additionnés d'hydrates de carbone, *S. marcescens* et *S. ki-*

liensis font fermenter la mannite, le maltose mais pas le lactose. *S. esseyana* fait fermenter le lactose mais pas la mannite ni le maltose.

16°) Parmi les différents milieux synthétiques utilisés en Microbiologie, le milieu synthétique L¹ de LASSEUR convient parfaitement pour la culture des trois germes. Sur ce milieu, le pH optimum pour la chromogénèse est voisin de pH = 5-5,6 pour *S. marcescens*; de pH = 5,40-6,44 pour *S. kiliensis* et de pH = 6,09 pour *S. esseyana*. La concentration optima en ions H + pour la végétation est réalisée lorsque le pH est de 6,09 pour *S. marcescens*, 5,40 pour *S. kiliensis*, 6,09 pour *S. esseyana*.

17°) Aucun des trois germes ne donne d'indol dans les milieux peptonés.

18°) Ils réduisent les nitrates en nitrites sans atteindre la formation d'azote.

19°) Dans les milieux peptonés, *S. marcescens*, *S. kiliensis* et *S. esseyana* produisent un dégagement d'hydrogène sulfuré. La quantité de gaz dégagée dans un temps donné est plus grande pour *S. marcescens* que pour *S. kiliensis*, plus grande pour ce dernier que pour *S. marcescens*.

20°) Les trois germes possèdent une résistance différente vis à vis de l'acide phénique pur.

Les doses infertilisantes d'acide phénique sont comprises entre 2 gr. et 2,50 o/oo pour *S. marcescens*, entre

1 gr. et 1 gr. 25 o/oo pour *S. kiliensis* et entre 1 gr. 25 et 2 gr. o/oo pour *S. esseyana*.

Les doses mortelles sont de 3 gr. o/oo pour *S. marcescens*, 1 gr. o/oo pour *S. kiliensis* et de 2 gr. o/oo pour *S. esseyana* (ces valeurs n'étant vraies que dans les conditions où nous avons opéré).

21°) Les trois germes sont de bons antigènes qui ont permis d'obtenir des sérums agglutinant à des taux élevés: 1/20000° pour *S. marcescens*, 1/25000° pour *S. kiliensis* et 1/32000° pour *S. esseyana*.

Les sérums anti-*S. marcescens*, anti-*S. kiliensis* et anti-*S. esseyana* possèdent, en dehors de leurs agglutinines spécifiques, des coagglutinines témoignant d'une « *parenté humorale* » entre les trois germes.

La dilution limite d'agglutination pour le germe homologue étant bien supérieure à la dilution limite d'agglutination hétérologue pour les deux autres germes, la sérologie permet de différencier facilement *S. marcescens*, *S. kiliensis* et *S. esseyana*.

22°) L'acide sulfurique et le sulfate d'alumine, dans une zone de concentrations donnée, détermine la précipitation des suspensions des trois germes.

23°) L'étude comparative de *S. marcescens*, *S. kiliensis* et de *S. esseyana* nous a fourni suffisamment de caractères différentiels pour considérer ce dernier germe comme une espèce nouvelle.

24°) Cultivé dans un milieu synthétique, *S. marcescens* ne donne son pigment qu'en présence de fer.

25°) En l'absence de fer *S. marcescens* donne cependant naissance à la substance mère de la prodigiosine et cela d'autant mieux que l'aération de la culture est plus grande.

26°) Les tampons de coton dont on se sert habituellement pour obturer les récipients de culture ne doivent pas être considérés comme une cause d'erreur importante dans l'étude de l'action du fer sur la chromogénèse des Bactéries.

27°) Nos expériences concernant l'action du fer sur la chromogénèse de *S. marcescens* permettent d'ajouter de nouveaux faits à l'appui de l'hypothèse de LASSEUR suivant laquelle le fer agit sur l'élaboration des pigments microbiens, non pas en tant que métal mais comme vecteur d'oxygène.

28°) Il est en effet possible d'obtenir la production de la prodigiosine, sinon en l'absence de fer (c'est un point que l'on ne peut jamais affirmer), du moins en présence de quantités de fer non décelables par les réactifs chimiques; il suffit pour cela de réaliser des conditions d'oxydation convenables dans les cultures de *S. marcescens*.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

SERRATIA ESSEYANA



0 10μ 20μ

Lasseur, Vernier. Zahl. Combe del.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

1. ACKERMANN (P.) et SCHÜTZE (H.). — Ueber Art und Herkunft der flüchtigen Basen von Kulturen des *Bacterium prodigiosum*. Arch. f. Hyg., 73 Bd., 1911.
2. AMAKO (T. H.). — Beiträge zur Kenntnis der Farbstoffbildung des *Bacillus prodigiosus*. Centralbl. f. Bakt., t. CXVI, p. 494-499, 1930.
3. ARENS (P.). — Als Erreger der roten Flecken auf frisch bereitetem Kautschuk. Centralbl. f. Bakt., II, Abt., 35 Bd., p. 405, 1912.
4. BÉGUET (M.). — Sur les conditions de l'apparition du pigment dans les cultures de *Bacillus prodigiosus*. C. R. Soc. Biol., XCVIII, p. 937-939, 1928.
5. BEIJERINCK. — Mutation bei Mikroben. Folia microbiologica Delft, I, Janrgang, 1912.
6. BEIJERINCK. — Variabilité chez *Bacillus prodigiosus*, Koninkl. Acad., V, wetenskappen, 1912.
7. BERTARELLI. — Untersuchungen und Beobachtungen über die Biologie und Pathogenität des *Bacillus prodigiosus*. Centralbl. f. Bakt., I, XXXIV, p. 193-202, 1903.

8. BERTARELLI. — Ueber den *Prodigosus* und die Theorien von der natürlichen Immunität. Centralbl. f. Bakt., I, Abt., XXXVII Bd., p. 617-626, 1904.
9. BESSON (A.). — Contribution à l'étude du Vibrion septique A. I. P., t. IX, p. 176-198, 1895.
10. BIZIO (B.). — Première publication non signée de l'auteur: Trovata della precisa cagione, che il produce il fenomeno del superficiale coloramento in rosso della polenta. Gazzeta privilegiata di Venezia, n° 910, 3-4, 1819, Ref. in BREED (R. S. et M. E.), 1924.
11. BIZIO (B.). — Lettera di Bartolomeo Bizio al chiarissimo canonico Angelo Bellani sopra il fenomeno della polenta porporino. Biblioteca Italiano o sia Giornale di Letteratura, Scienze e Arti. Appendice Tomo 30, Anno 8, Aprile, Maggio, e Giugno, 275-295, 1823. (In BREED (R. S. et M. E.) 1924).
12. BIZIO (B.). — Del fenomeno della polenta porporino. Opusculi Chimicofisici, Tomo 1, Parte 2, Recherche e spiegazioni di alcuni fenomeni, Articolo 1, 261-298, Giuseppe Antonelli, Venezia 1827.
13. BIZIO (B.). — Sur une altération du pain causée par le développement d'un cryptogame; observation faite, il y a très longtemps, d'un phénomène qui rentre dans la classe de ceux sur lesquels MÖSER a appelé l'attention. C. R. Acad. Sc., Paris, 18, p. 951-954, 1844.
14. BOHN. — L'évolution du pigment. Scientia Biologie, n° 11, 1901.

15. BORTELS (H.). — Ueber die Bedeutung von Eisen, Zinck und Kupfer für Mikroorganismen, Biochem. Ztschr., 301-358, 1927.
16. BREED (R. S. et M. E.). — The type species of genus *Serratia*, comonly known as *Bacillus prodigiosus*. J. of Bact., Balt., t. 9, p. 545-557.
17. BREUNIG (J.). — Bacteriologische Untersuchung des Trinkwassers der Stadt Kiel. Inaug. Diss., Kiel, 1888.
18. BROQUIN-LACOMBE (A.). — Sur un caractère différentiel entre *Bacillus mesentericus niger* et *Bacillus lactis niger*. C. R. Soc. Biol., t. II, p. 589-600, 1913.
19. BUCHANAN (R. E.). — Studies in the nomenclature and classification of the Bacteria. J. Bact., t. 3, p. 27-61, 1918.
20. COHN (E.). — Untersuchungen über Bakterien. Beitr. z. Biol. d. Pflanzen, Bd. I, Heft 2, p. 127-151, 1872.
21. CORDIER (M.), RAJAT (H.) et PÉJU (G.). — Cultures achromogènes de *Micrococcus prodigiosus* en présence de liquides à haute tension de vapeur. C. R. Soc. Biol. t. 2, 1908.
22. CORDIER (M.), PÉJU (G.) et RAJAT (H.). — Influence de la lumière blanche diffuse et de ses diverses radiations sur la fonction chromogène de *Micrococcus prodigiosus*. C. R. Soc. Biol., t. 2, 1908.
23. COUDRAY (G.). — Contribution à l'étude de la coloration de GRAM. Thèse de Pharmacie, Nancy, 1929.

24. DELANOE. — Deuxième note sur la biologie de *Bacillus prodigiosus*. C. R. Soc. Biol., t. LX, p. 728, 1906.
25. DE TONI et TREVISAN. — *Schyzomicetaceae*, Naeg. P. A. Saccardo's Sylloge fungorum, t. 8, p. 923-1027, 1889.
26. DUCLAUX (E.). — Traité de microbiologie. Masson et Cie, Edit., Paris, 1898.
27. EHRENBERG (C. G.). — Fortsetzung der Beobachtung des sogenannten Blutes in Brode als *Monas pro-prodigiosa*. Acad. d. Wissenschaften, p. 354-362, 1849.
28. EHRENBERG (C. G.). — Fernere Mittheilungen über *Monas prodigiosa* oder die Purpurmonade. Ibid., p. 101-116.
29. EISENBERG (Ph.). — Ueber Mutationen bei Bakterien und anderen Mikroorganismen. Ergebn. d. Immunität forchen, 28, 142, 1914.
30. FLÜGGE (C.). — Die Mikroorganismen. F. C. W. Vogel, Leipzig, 1886.
31. FORTINEAU (L.). — *L'Erythrobacillus pyosepticus* et les Bactéries rouges. Thèse méd., Paris, 1904.
32. GORBACH (G.). — Zur Kenntnis des Farbstoffes des *Bacillus prodigiosus*. Arch. f. Mik., 1930, I Bd., p. 368-380.
33. GORINI (C.). — Das *Prodigiosus*-Labferment. Hyg. Rundschau, Bd. III, p. 381, 1893.
34. GRAWITZ et DE BARY. — Arch. f. Pathol. Anat. u. Physiol., Bd. CVIII, 1887.

35. GRIFFITHS (A. B.). — Sur la matière colorante de *Monas prodigiosa*. C. R. Acad. Sc., t. CXV, p. 321, 1892.
36. GROER (F. von). — Ueber die Prodigiosusgelatinase. Biochem. Ztschr. 38, p. 252-254, 1912.
37. HEFFERAN (M.). — A comparative and experimental study of bacilli producing red pigment. Centralbl. f. Bakt., II Abt. XI Bd., p. 311-317, 1904; Ibid., p. 456-475.
38. HEFFERAN (M.). — Agglutination and biological relationship in *prodigiosus* group. Centralbl. f. Bakt., 41 Bd., p. 553-562, 1906.
39. HIJMANS VAN DER BERG. — Sur l'attitude du Gonocoque envers la coloration de GRAM. Centralbl. f. Bakt., I Abt., 20 Bd., p. 785-792, 1896.
40. JAROSLAV PEKLO. — Die pflanzlichen Aktinomykosen. Centralbl. f. Bakt. II, Bd. 27, p. 545, 1910.
41. KÖGL et POSTOWSKY. — Ueber das grüne Stoffwechselprodukt des *Bacillus chlororaphis*. Liebigs Ann. der Chemie, Bd. 480, Heft 2-3, 1930.
42. KRAFT (E.). — Beiträge zur Biologie des *Bacterium prodigiosum* und chemischen verhalten seines Pigmentes. Inaug. Diss. Apoth. Würtzburg, 1902.
43. KUNTZE (W.). — Weitere bemerkungen zur Farbstoffbildung des *Prodigiosus*. Centralbl. f. Bakt., II Abt., XLIV Bd., 299-309, 1907.

44. LASSEUR (Ph.). — Contribution à l'étude de *B. chlororaphis* G. et S., Thèse Sc. Nat., Nancy, 1911.
45. LASSEUR (Ph.). — Observations sur le pouvoir chromogène de quelques Bactéries. Recueil publié à l'occasion du jubilé scientifique du professeur LE MONNIER. Imp. Berger-Levrault, Nancy, 1913.
46. LASSEUR (Ph.). — Contribution à l'étude de *Bacillus Le Monnieri*, nov. spec., p. 47-48. C. R. Soc. Biol. 74, 1913. Influence du fer sur la végétation et la coloration des cultures de diverses Bactéries, Ibid., p. 496-498.
47. LASSEUR (Ph.) et THIRY (G.). — Nouvelles colorations présentées par certains microorganismes cultivés en milieu synthétique. Ibid.
48. LASSEUR (Ph.), THIRY (G.) et DUPAIX (A.). — Le fer dans la vie microbienne. Influence du fer sur la coloration des cultures de *B. caryocyaneus* BELJERINK-DUPAIX. Trav. du Lab. Microbiol., Nancy, Fasc. III, p. 53, 1930.
49. LASSEUR (Ph.) et NOBLAT (A. M.). — Agglutination des Bacilles du groupe *B. prodigiosus* et *B. balticus*. Trav. Lab. Microbiol. Nancy, Fasc. I, 1928.
50. LASSEUR et GIRARDET. — Contribution à l'étude des pigments microbiens. Nancy, 1922.
51. LASSEUR (Ph.) et THIRY (G.). — Sur les cultures de Bactéries considérées jusqu'à présent comme achromogènes. C. R. Acad. Sc., t. 156, p. 166-168, 1913.

52. LASSEUR (Ph.) et SCHMITT. — Etude de la réaction de GRAM. Ann. I. P. t. 41, p. 554 et suiv., 1927.
53. LASSEUR (Ph.), MARCHAL (J.) et DUPAIX (A.), Modifications temporaires, modifications durables observées chez les Bactéries. Trav. Lab. Microbiol. Nancy, p. 105-158, Fasc. III, 1930.
54. LASSEUR (Ph.), VERNIER (P.), DUPAIX (A.) et COMBE (E.), Action des ions H^+ sur les suspensions de *B. prodigiosus*. Répartition et désorption de la prodigiosine. Adsorption des ions H^+ par les plastides bactériennes. Ibid. Fasc. IV, p. 73-83, 1931.
55. LASSEUR (Ph.), COMBE (E.) et DUPAIX (A.), Influence du fer sur la production de la prodigiosine. Ibid. p. 45-55.
56. LASSEUR (Ph.), DOMBRAY (P.) et DUPAIX (A.), Relation entre la concentration en ions H^+ des milieux de culture, la végétation et la chromogénèse bactérienne. Ibid. p. 13-30.
57. LEHMANN (K. P.) et NEUMANN (R.). — Atlas und Gunders der Bakteriologie. München, p. 448, 1896.
58. LINOSSIER (G.). — Sur une hématine végétale, l'aspergilline, pigment des spores de l'*Aspergillus niger*. Ann. Micrographie, t. III, p. 359, 1889-1890.
59. LUX (A.). — Ueber den gehalt der frisch gemolknen Milch an Bakterien. Centralbl. f. Bakt., II Abt., p. 200, 1903.
60. MACÉ (E.). — Traité pratique de bactériologie, p. 347-351, 1889.

61. MARX (H.). — Die Pathogenität des *B. prodigiosus*.
Ein Bemerkung zur Farbstoffproduktion der Bakterien. Arch. f. Klin. Chirurgie, Bd. LXIII, p. 347, 1900.
62. MENEGHINI, cf. TREVISAN 1887, p. 799.
63. MINOUX (M.). — Considérations générales sur la forme des Bactéries. Thèse Pharm., Nancy, 1927.
64. MONTAGNE (C.). — Coloration rouge des substances alimentaires par la présence du *Monas (Palmella mihi) prodigiosa*. Ehren., Bull. Soc. Nat. et Centr. d. Agric., Paris, 2 ser., p. 527-530, 1853.
65. NAKANISHI (K.). — Ueber den Bau der Bakterien. Centralbl. f. Bakt. I, 30, p. 106, 1901.
66. NEIDE (E.). — Die Alcholorntfärbung der nach Gram gefärbten Bakterien als spezifische diagnose in Verbindung, mit einer Untersuchung der für die Gramfärbung in Betracht kommenden faktoren. Centralbl. f. Bakt., I, 33, p. 508-521, 1904.
67. NEPVEUX (F.). — Une nouvelle espèce chromogène des eaux. Thèse Pharm. Nancy, 1920.
68. NOVY. — Ztschr. f. Hyg., t. XVII, p. 209, 1894.
69. ORLA-JENSEN (S.). — Die Hauptlinien des natürlichen Bakteriensystem. Centralbl. f. Bakt., II, p. 305-346, 1909.
70. PEDERSON et BREED. — The fermentation of glucose by organisms of the genus *Serratia*. J. Bact. Balt., t. XVI, p. 163-185, 1928.

71. PÉJU (G.) et RAJAT (H.). — Pigment normal du *Micrococcus prodigiosus* et teintes dégradées de ce pigment. Bull. Soc. Med. Hopit., Lyon, t. VI, p. 150-151, 1907.
72. PÉJU (G.). — Sur les températures de mort de *Micrococcus prodigiosus*. C. R. Soc. Biol., t. 2, 1908.
73. PRILLIEUX. — Corrosion des grains de blé colorés en rose par les Bactéries. Bull. Soc. Bot., p. 31, 1879.
74. RÉGNIER (J.) et LAMBIN (S.). — Contribution à l'étude de la mesure des valeurs antimicrobiennes. Bull. Acad. Med., t. CV, p. 1-10, 1931.
75. RITTER (G.). — Zur Physiologie des *Bacillus prodigiosus*. Centralbl. f. Bakt., II Abt., VI Bd., p. 206-209, 1900.
76. ROGER (G. H.). — Influence des produits solubles du *B. prodigiosus* sur l'infection charbonneuse. C. R. Soc. Biol., p. 375-376, 1895.
77. ROGER (G. H.). — De quelques causes qui modifient l'immunité naturelle. C. R. Soc. Biol., p. 476-479, 1889.
78. ROGER (G. H.). — Les produits microbiens qui favorisent le développement des infections. C. R. Acad. Sc., t. II, p. 192-195, 1889.
79. ROGER (G. H.). — Quelques effets des associations microbiennes. C. R. Soc. Biol., t. I, p. 35-38, 1893.

80. ROGER (G. H.). — Inoculation du charbon symptomatique au Lapin. C. R. Soc. Biol., p. 780, 1889.
81. ROSENBERG (W. W.). — Beiträge zur Kenntnis der Bakterien Farbstoffe insbesondere der Gruppe des *Bacterium prodigiosum*. Diss. Würzburg, 1899.
82. ROLIN (M.). — La forme des Bactéries. Thèse Pharm., Nancy, 1929.
83. SAMKOW (S.). — Zur Physiologie des *B. prodigiosus* Centralbl. f. Bakt., VI Bd., p. 305-311, 1903.
84. SASAKI et OTSUKA. — Biochem. Ztschr. 39 Bd., p. 208-215, 1912.
85. SCHEURLÉN. — Geschichtliche und experimentelle Studien über den *Prodigiosus*. Arch. f. Hyg., München u. Leipzig, t. 26, p. 1-31, 1896.
86. SCHNEIDER (P.). — Die Bedeutung der Bakterienfarbstoff für die Unterscheidung der Arten. Diss., Basel, 1894.
87. SCHOTELLIUS (M.). — Biologische Untersuchungen über der *Micrococcus prodigiosus*. Festschrift, a. v. Kölliker gewidmet, Leipzig, S. 185, 1887.
88. SCHROETER (J.). — Beiträge zur Biologie der Pflanzen. Ibid., p. 109-126, 1875.
89. SCHROETER (J.). — Ueber einige durch Bakterien gebildete Pigmente. Beitr. z. Biol. d. Pflanzen Bd. I, Heft 2, p. 109-126, 1872.

90. SETTE (V.). — Memoria storico-naturale sull'arrossimento straordinario di alcune sostanze alimentari osservato nella provincia di Padova l'anno MDCCXCIX, Letta al Atheneo di Treviso nella sera 28 aprile 1820 Alvisopoli, Venezia, 65 pp.
91. SULLIVAN. — Die Chemie der Bakterienpigmente. Centralbl. f. Bakt. II, X Bd., p. 386, 1903.
92. TEMPÉ. — Technique simple de culture en surface des microbes anaérobies. C. R. Soc. Biol., t. CVII, p. 1021, 1931.
93. THEVENIN (P.). — Contribution à l'étude des Bactéries chromogènes. Thèse Med., Toulouse 1897-1898.
94. TREVISAN (V.). — Prime linee d'introduzione allo studio dei Batteri italiani. R. Istituto Lomb. di Scienze e Lettere, ser. 2, 12, p. 54-62, 1879.
95. TREVISAN (V.). — Se sia vero che il *Bacillo imetrofo* (*Micrococcus prodigiosus*) preceda sempre come agente specifico predisponente il calcino del baco da seta. Ibid., ser. 2, fasc. 20, p. 797-804, 1887.
96. VELU et DALOZT. — C. R. Soc. Biol., p. 1095, 1929.
97. VUILLEMIN (P.). — Annales mycologiques, vol. XI, n° 6, 1913.
98. WAHLIN (J. C.). — A study of rennin action. I. Rennin production by *Bacillus prodigiosus* J. Bact. Balt., t. XVI, p. 355-373, 1928.
99. WASSERZUG (E.). Variation de forme chez les Bactéries. A. I. P., t. 2, p. 75-83, 1888.

100. WINSLOW (C. E.). et al. — The families and genera of the bacteria. J. Bact., t. 5, p. 512-527, 1920.
 101. WREDE (F.). et HETTICHE (O.). — Ueber das prodigiosin, den roten Farbstoff des *Bacillus prodigiosus*. Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft. Jarg. 62, Heft 9, 2678-2665, 1929.
 102. ZANARDINI, 1863, cf. TREVISAN, 1887, p. 799.
-

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

Introduction	7
--------------------	---

Chapitre préliminaire. — Nomenclature et synonymie	11
--	----

PREMIÈRE PARTIE

Etude bibliographique de *Serratia marcescens* Bizio

(*Bacillus prodigiosus* Flügge)

et de *Serratia kiliensis* Comité S. B. A.

(*Bacterium* h Breunig)

Chapitre I. — Historique	21
Chapitre II. — Habitat	33
Chapitre III. — Morphologie	35
Chapitre IV. — Caractères de culture	43
Chapitre V. — Pouvoir pathogène et rôle dans les associations microbiennes	57
Chapitre VI. — Agglutination	67
Chapitre VII. — Pouvoir chromogène	75
Chapitre VIII. — Modifications observées chez <i>S. marcescens</i> et chez <i>S. kiliensis</i>	89

DEUXIÈME PARTIE

Etude expérimentale et comparative de	
<i>Serratia marcescens</i> Bizio (Bacillus prodigiosus (Flügge);	
<i>Serratia kiliensis</i> Comité S. B. A. (Bacterium h Breunig);	
<i>Serratia esseyana</i> Combe (Bacille rouge d'Essey Lasseur).	
Chapitre I. — Morphologie	97
Chapitre II. — Caractères de culture	109
Chapitre III. — Action antiseptique de l'acide phé- nique	131
Chapitre IV. — Etudes des caractères sérologiques..	135
Chapitre V. — Précipitation des plastides par $SO_4 H^2$ et $(SO_4)^+ Al^3$	141

TROISIÈME PARTIE

Contribution à l'étude du mécanisme et de l'action du fer dans la chromogénèse de <i>S. marcescens</i> .	
Chapitre I. — Aperçu historique	149
Chapitre II. — Recherches nouvelles	151
CONCLUSIONS GÉNÉRALES	163
INDEX BIBLIOGRAPHIQUES	171

ERRATA

- Page 7. — Ligne 3 : au lieu de *bactérie* lire *Bactérie*.
- Page 17. — Première ligne de la note : au lieu d'*esseyana* lire *esseyana*.
- Page 24. — Ligne 15 : au lieu de *ce fait ne manque de...* lire *ce fait ne manque pas de...*
- Page 30. — Ligne 1 : au lieu de *nombre d'animalicules* lire *nombre d'animacules*.
- Page 49. — Ligne 6 : au lieu d'*enduis* lire *enduit*.
- Page 51. — Ligne 11 : au lieu d'*amoniague* lire *ammoniaque*.
- Page 59. — Ligne 9 : au lieu de *et de De Bary*, lire *et De Bary*.
- Page 67. — Ligne 11 : au lieu de *nette entre les Bactéries pathogènes* lire *bien nette entre les Bactéries caprophyles et les Bactéries pathogènes*.
- Ligne 79. — Ligne 6 : au lieu de *défaorable* lire *défavorable*.
- Page 100. — Ligne 6 et 8 avant la fin : au lieu de *rapport L/e* lire *rapport L/l*.
- Page 110. — Ligne 18 : au lieu de *scellés à nouveau* lire *scellée à nouveau*.
-

Vu et bon à imprimer,

Nancy, le 10 juillet 1933.

Le Doyen,

P. SEYOT.

Vu et permis d'imprimer.

Nancy, le 10 juillet 1933.

*Le Recteur de l'Académie,
Président du Conseil de l'Université,*

L. BRUNTZ.

